

Université de Montréal

Les R-loops et leurs conséquences sur l'expression génique chez *Escherichia coli*

Par

Imad Baaklini

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade Philosophiae Doctor (Ph.D)
En Microbiologie et Immunologie

Le 20 février 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

Les R-loops et leurs conséquences sur l'expression génique chez *Escherichia coli*

Présenté par :
Imad Baaklini

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr. George Szatmari

Membre du jury : Dr. Patrick Hallenbeck

Examineur externe : Dr. Éric Massé

Directeur de recherche : Dr. Marc Drolet

Représentant du doyen de la FES : Dr. George Szatmari

RÉSUMÉ

Des variations importantes du surenroulement de l'ADN peuvent être générées durant la phase d'élongation de la transcription selon le modèle du « twin supercoiled domain ». Selon ce modèle, le déplacement du complexe de transcription génère du surenroulement positif à l'avant, et du surenroulement négatif à l'arrière de l'ARN polymérase. Le rôle essentiel de la topoisomérase I chez *Escherichia coli* est de prévenir l'accumulation de ce surenroulement négatif générée durant la transcription. En absence de topoisomérase I, l'accumulation de ce surenroulement négatif favorise la formation de R-loops qui ont pour conséquence d'inhiber la croissance bactérienne. Les R-loops sont des hybrides ARN-ADN qui se forment entre l'ARN nouvellement synthétisé et le simple brin d'ADN complémentaire. Dans les cellules déficientes en topoisomérase I, des mutations compensatoires s'accumulent dans les gènes qui codent pour la gyrase, réduisant le niveau de surenroulement négatif du chromosome et favorisant la croissance. Une des ces mutations est une gyrase thermosensible qui s'exprime à 37 °C. La RNase HI, une enzyme qui dégrade la partie ARN d'un R-loop, peut aussi restaurer la croissance en absence de topoisomérase I lorsqu'elle est produite en très grande quantité par rapport à sa concentration physiologique. En présence de topoisomérase I, des R-loops peuvent aussi se former lorsque la RNase HI est inactive. Dans ces souches mutantes, les R-loops induisent la réponse SOS et la réplication constitutive de l'ADN (cSDR).

Dans notre étude, nous montrons comment les R-loops formés en absence de topoisomérase I ou RNase HI peuvent affecter négativement la croissance des cellules. Lorsque la topoisomérase I est inactivée, l'accumulation d'hypersurenroulement négatif conduit à la formation de nombreux R-loops, ce qui déclenche la dégradation de l'ARN synthétisé. Issus de la dégradation de l'ARNm de pleine longueur, des ARNm incomplets et traductibles s'accumulent et causent l'inhibition de la synthèse protéique et de la croissance. Le processus par lequel l'ARN est dégradé n'est pas encore complètement élucidé, mais nos résultats soutiennent fortement que la RNase HI présente en concentration physiologique est responsable de ce phénotype. Chose importante, la RNase E qui est l'endoribonuclease majeure de la cellule n'est pas impliquée dans ce processus, et la dégradation de l'ARN survient avant son action. Nous montrons aussi qu'une corrélation parfaite existe entre la concentration de RNase HI, l'accumulation d'hypersurenroulement négatif et l'inhibition de la croissance bactérienne. Lorsque la RNase HI est en excès, l'accumulation de surenroulement négatif est inhibée et la croissance n'est pas affectée. L'inverse se produit

Lorsque la RNase HI est en concentration physiologique. En limitant l'accumulation d'hypersurenroulement négatif, la surproduction de la RNase HI prévient alors la dégradation de l'ARN et permet la croissance.

Quand la RNase HI est inactivée en présence de topoisomérase I, les R-loops réduisent le niveau d'expression de nombreux gènes, incluant des gènes de résistance aux stress comme *rpoH* et *grpE*. Cette inhibition de l'expression génique n'est pas accompagnée de la dégradation de l'ARN contrairement à ce qui se produit en absence de topoisomérase I. Dans le mutant déficient en RNase HI, la diminution de l'expression génique réduit la concentration cellulaire de différentes protéines, ce qui altère négativement le taux de croissance et affecte dramatiquement la survie des cellules exposées aux stress de hautes températures et oxydatifs. Une inactivation de RecA, le facteur essentiel qui déclenche la réponse SOS et le cSDR, ne restaure pas l'expression génique. Ceci démontre que la réponse SOS et le cSDR ne sont pas impliqués dans l'inhibition de l'expression génique en absence de RNase HI.

La croissance bactérienne qui est inhibée en absence de topoisomérase I, reprend lorsque l'excès de surenroulement négatif est éliminé. En absence de RNase HI et de topoisomérase I, le surenroulement négatif est très relaxé. Il semble que la réponse cellulaire suite à la formation de R-loops, soit la relaxation du surenroulement négatif. Selon le même principe, des mutations compensatoires dans la gyrase apparaissent en absence de topoisomérase I et réduisent l'accumulation de surenroulement négatif. Ceci supporte fortement l'idée que le surenroulement négatif joue un rôle primordial dans la formation de R-loop. La régulation du surenroulement négatif de l'ADN est donc une tâche essentielle pour la cellule. Elle favorise notamment l'expression génique optimale durant la croissance et l'exposition aux stress, en limitant la formation de R-loops. La topoisomérase I et la RNase HI jouent un rôle important et complémentaire dans ce processus.

Mots Clés : Surenroulement de l'ADN, Hypersurenroulement négatif, Topoisomérase I bactérienne, Transcription, R-loop, RNase HI, Expression génique.

ABSTRACT

Important fluctuations of DNA supercoiling occur during transcription in the frame of the “twin supercoiled domain” model. In this model, transcription elongation generates negative and positive supercoiling respectively, upstream and downstream of the moving RNA polymerase. The major role of bacterial topoisomerase I is to prevent the accumulation of transcription-induced negative supercoiling. In its absence, the accumulation of negative supercoiling triggers R-loop formation which inhibits bacterial growth. R-loops are DNA/RNA hybrids formed during transcription when the nascent RNA hybridizes with the template strand thus, leaving the non-template strand single stranded. In cells lacking DNA topoisomerase I, a constant and selective pressure for the acquisition of compensatory mutations in gyrase genes reduces the negative supercoiling level of the chromosome and allows growth. One of these mutations is a thermosensitive gyrase expressed at 37 °C. The overexpression of RNase HI, an enzyme that degrades the RNA moiety of an R-loop, is also able to correct growth inhibition in absence of topoisomerase I. In the presence of topoisomerase I, R-loops can also form when RNase HI is lacking. In these mutants, R-loop formation induces SOS and constitutive stable DNA replication (cSDR).

In our study, we show how R-loops formed in cells lacking topoisomerase I or RNase HI can affect bacterial growth. When topoisomerase I is inactivated, the accumulation of hypernegative supercoiling inhibits growth by causing extensive R-loop formation which, in turn, can lead to RNA degradation. As a result of RNA degradation, the accumulation of truncated and functional mRNA instead of full length ones, is responsible for protein synthesis inhibition that alters bacterial growth. The mechanism by which RNA is degraded is not completely clear but our results strongly suggest that RNase HI is involved in this process. More importantly, the major endoribonuclease, RNase E, is not involved in RNA degradation because RNA is degraded before its action. We show also that there is a perfect correlation between RNase HI concentration, the accumulation of hypernegative supercoiling and bacterial growth inhibition. When RNase HI is in excess, no accumulation of hypernegative supercoiling and growth inhibition are observed. The opposite is true when RNase HI is at its wild type level. By preventing the accumulation of hypernegative supercoiling, the overproduction of RNase HI inhibits extensive R-loop formation and RNA degradation, thus, allowing growth.

In absence of RNase HI (*rnhA*) and in presence of topoisomerase I, R-loops are also responsible for an inhibition in gene expression, including stress genes such as *rpoH* and *grpE*. The inhibition of gene expression is not related to RNA degradation as seen in absence of topoisomerase I but it is rather related to a reduction in gene expression. In absence of RNase HI, the diminution of genes expression is responsible for a reduction in the cellular level of proteins, which negatively affects bacterial growth and bacterial survival to heat shock and oxydative stress. Additional mutations in RecA, the protein that activates SOS and cSDR after R-loop formation in *rnhA*, do not correct this phenotype in *rnhA*. Thus, SOS and cSDR are not directly involved in the inhibition of gene expression in the absence of RNase HI.

In absence of topoisomerase I, growth inhibition resumes when hypernegative supercoiling is reduced. When compared to wild type strains, DNA is very relaxed in absence of RNase HI and topoisomerase I. It seems that R-loop formation induces the relaxation of negatively supercoiled DNA. All this strongly supports the idea that negative supercoiling plays an important role in R-loop formation. Finally, our work shows how essential negative supercoiling regulation is for cell physiology. By preventing R-loop formation, regulation of negative supercoiling allows optimal gene expression, which is crucial for cellular growth and for stress survival. Both topoisomerase I and RNase HI play an important and complementary role in this process.

Key Words : DNA supercoiling, Hypernegative supercoiling, bacterial Topoisomerase I, Transcription, R-loop, RNase HI, Gene Expression.

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION	1
1. Le surenroulement de l'ADN	1
1.1 Définition	1
1.2 Dynamique du surenroulement	1
2. Les topoisomérases	2
2.1 Les topoisomérases de types IA	5
2.1.1 La topoisomérase I bactérienne	5
2.1.2 La topoisomérase III	7
2.2 Les topoisomérases de type IIA	13
2.2.1 La gyrase	13
2.2.2 La topoisomérase IV	16
2.3 La régulation du surenroulement de l'ADN	17
3. Organisation de l'ADN chez les procaryotes	19
3.1 Les facteurs impliqués dans l'organisation de l'ADN chromosomique	21
3.1.1 La gyrase	21
3.1.2 Les protéines similaires aux histones	21
3.1.3 Les protéines SMC	23
3.2 Les autres protéines impliquées dans l'organisation de l'ADN chromosomique	24
3.3 Contribution des différentes protéines similaires aux histones dans l'organisation de l'ADN chromosomique	24
3.4 Rôle de la réplication et de la transcription dans l'organisation de l'ADN chromosomique	25
4. Le surenroulement de l'ADN et la transcription	26
4.1 Le surenroulement de l'ADN et l'initiation de la transcription	26
4.2 Le surenroulement de l'ADN et l'élongation de la transcription : le modèle du « twin supercoiled domain »	28

5. Les R-loops	30
5.1 Définition	30
5.2 L'endoribonucléase HI : la RNase HI	31
5.3 La séquence nucléotidique et la formation des R-loops	31
5.4 Le surenroulement négatif de l'ADN et la formation des R-loops	34
5.5 L'hypersurenroulement négatif de l'ADN et les R-loops	35
5.6 Mécanismes de formation des R-loops	37
 6. Les R-loops et les activités génomiques	 40
6.1 Les R-loops et la réplication des plasmides ColE1	40
6.2 Les R-loops et la réplication de l'ADN mitochondrial	40
6.3 Les R-loops et les gènes qui codent pour les Immunoglobulines	41
6.4 Les R-loops et le cSDR	42
6.4.1 Le cSDR	42
6.4.2 Les facteurs impliqués dans le cSDR	43
6.5 Les R-loops et l'instabilité génomique	45
6.6 Les R-loops et la réponse SOS	47
6.7 Les R-loops et leurs effets sur l'expression génique	50
 7. Projet de recherche	 52
 II. ARTICLE 1 : Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation	 56
1. Contributions	57
2. Résumé	58
2. Summary	59
3. Introduction	60
4. Materials and Methods	62
5. Results	67
6. Discussion	84
7. Acknowledgements	88
8. References	89

Liens entre l'article 1 et l'article 2	93
III. ARTICLE 2 : RNase HI activity is required for optimal gene expression in <i>Escherichia coli</i>	94
1. Contributions	95
2. Résumé	96
3. Summary	97
4. Introduction	98
5. Results	100
6. Discussion	114
7. Experimental procedures	116
8. Acknowledgments	118
9. References	119
IV. DISCUSSION	122
1. Les ARNm courts inhibent la synthèse protéique en absence de topoisomérase I	122
2. Origine des ARNm incomplets en absence de topoisomérase I	130
2.1 Les R-loops et les blocages de la transcription	130
2.2 Stabilité des R-loops et leurs effets sur l'expression génique	135
2.3 L'hypersurenroulement négatif de l'ADN et la production d'ARN incomplets	139
2.4 La dégradation des ARN et la production d'ARN incomplets : le rôle de la RNase HI	142
V. CONCLUSION	150
VI. RÉFÉRENCES	153
VII. REMERCIEMENTS	178
LISTE DES TABLEAUX	
II ARTICLE 1	

<u>Tableau 1</u> : <i>Escherichia coli</i> strains used in this study.	66
---	-----------

III ARTICLE 2

Tableau 1: Liste of <i>E.coli</i> strains used in this study	118
---	------------

IV. DISCUSSION

<u>Tableau I</u> : Activité des extraits S30 à 28 °C des souches	129
---	------------

gyrB(Ts) et *topA gyrB*(Ts).

<u>Tableau II</u> : Synthèse de β -galactosidase dans le mutant <i>rnhA recA</i> .	137
---	------------

LISTE DES FIGURES

I. INTRODUCTION

<u>Figure 1</u> : Les différents états de surenroulement de l'ADN.	3
<u>Figure 2</u> : Relation entre la torsion (Twist) de l'ADN et le surenroulement (Writhe) de l'ADN.	4
<u>Figure 3</u> : Les différentes activités des topoisomérases de type I.	8
<u>Figure 4</u> : Structure de la topoisomérase I et de la topoisomérase III bactérienne.	9
<u>Figure 5</u> : Mécanisme d'action de la topoisomérase I bactérienne.	10
<u>Figure 6</u> : Séquence nucléotidiques de la région promotrice du gène <i>topA</i> .	11
<u>Figure 7</u> : Les différentes activités des topoisomérases de type II.	14
<u>Figure 8</u> : Mode d'action de la gyrase.	15
<u>Figure 9</u> : La régulation du surenroulement de l'ADN par les activités antagonistes de la gyrase et de la topoisomérase I.	18
<u>Figure 10</u> : L'organisation de l'ADN chromosomique en domaines.	20
<u>Figure 11</u> : Le modèle du « twin supercoiled domain ».	29
<u>Figure 12</u> : Schéma d'un R-loop.	32
<u>Figure 13</u> : Les facteurs et mécanismes impliqués dans l'élimination d'un R-loop.	33
<u>Figure 14</u> : Le « R-loop self promoting cycle ».	36
<u>Figure 15</u> : Modèle de la formation d'un R-loop.	39

<u>Figure 16</u> : Rôle des protéines SR ASF/SF2 dans la stabilité génomique chez la levure.	48
--	-----------

<u>Figure 17</u> : Mécanisme du CSR déclenché par la formation de R-loop et par l'action de l'AID.	49
--	-----------

II. ARTICLE 1

<u>Figure 1</u> : Correlation between hypernegative supercoiling and growth inhibition after temperature downshifts.	68
--	-----------

<u>Figure 2</u> : Association of <i>yhdG</i> and <i>fis</i> mRNAs with ribosomes after a temperature downshift.	73
---	-----------

<u>Figure 3</u> : Association of <i>crp</i> mRNAs with ribosomes after a temperature downshift.	75
---	-----------

<u>Figure 4</u> : Protein synthesis after a temperature downshift.	76
---	-----------

<u>Figure 5</u> : Expression and processing of <i>fis</i> mRNAs after a temperature downshift.	79
---	-----------

<u>Figure 6</u> : Expression and processing of <i>lac</i> mRNAs after a temperature downshift.	80
---	-----------

<u>Figure 7</u> : The effects of <i>rne114</i> and spectinomycin on the processing of <i>lacA</i> mRNAs after a temperature downshift.	81
--	-----------

<u>Figure 8</u> : R-loop formation on hypernegatively supercoiled templates <i>in vitro</i> .	83
--	-----------

III. ARTICLE 2

<u>Figure 1</u> : The effect of the temperature on the growth of <i>rnhA</i> mutants.	101
--	------------

<u>Figure 2</u> : β -galactosidase synthesis in <i>rnhA</i> mutants.	102
---	------------

<u>Figure 3</u> : <i>crp</i> mRNA level in <i>rnhA</i> mutants.	103
<u>Figure 4</u> : The “classical” heat shock response is delayed in <i>rnhA</i> mutants.	107
<u>Figure 5</u> : Delayed σ_{32} accumulation in <i>rnhA</i> mutants during a “classical” heat shock.	108
<u>Figure 6</u> : Thermosensitivity of <i>rnhA</i> mutants at 51 °C correlates with reduced <i>rpoH</i> mRNA and σ_{32} synthesis.	109
<u>Figure 7</u> : <i>rnhA</i> mutants exposed to 10% ethanol fail to induce the synthesis of <i>rpoH</i> mRNA.	111
<u>Figure 8</u> : Overproduction of RecG does not correct thermosensitivity and σ_{32} expression problems at 51 °C in <i>rnhA</i> , and the inactivation of <i>recG</i> shows no alteration in σ_{32} expression at 51 °C.	112
<u>Figure 9</u> : <i>rho112(ts)</i> renders an <i>rnhA</i> mutant very sick at 30 °C.	113

IV. DISCUSSION

<u>Figure 1</u> : La région « leader » de l’ARN ribosomal.	124
<u>Figure 2</u> : Maturation des ARNr de l’opéron <i>rrnB</i> .	125
<u>Figure 3</u> : Modèle du blocage de la transcription par un R-loop.	131
<u>Figure 4</u> : Stabilité de <i>yhdG</i> et <i>fis</i> à 28 °C en absence de topoisomérase I.	144
<u>Figure 5</u> : Principal mode de dégradation de l’ARN chez <i>Escherichia coli</i> .	145
<u>Figure 6</u> : Modèle de la production d’ARN incomplets par la RNase HI.	148

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5', 3' : extrémité 5 prime, extrémité 3 prime

ADN : Acide désoxyribonucléotide

AID : Activation-induced cytidine deaminase

ARN : Acide ribonucléotide.

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

A,T,G,C : Adénine, Thymidine, Guanine, Cytosine

ADP : Adénosine monophosphate

ATP : Adénosine triphosphate

cSDR : constitutive Stable DNA replication

°C : Degrés Celsius

CSR : Class switch recombination

CRP : Catabolic repressor protein

Dps : DNA protection from starvation

E. coli : *Escherichia coli*

Fis : Factor for inversion sequence

H-NS : Heat-stable-nucleotid-structuring

HU : "Histone Like" protein from *E.coli* strain U93

IHF : Integretion host factor

Ig : Immunoglobuline

Kb : Kilo base

Lk : Linking number

Mg²⁺ : Ion magnesium

OH : Hydroxyle

OriC : Origine de réplication C

OriK : Origine de réplication K

PM : Poids moléculaire

PNPase : Polyphosphonucleotide ribonuclease

R-M : Restriction Modification

RnhA : gène qui code pour la RNase HI. Mutant déficient en RNase HI.

RNase : Ribonucléase

rrn : opéron ribosomal

iSDR : induced Stable DNA replication

SDR : Stable DNA replication

SMC : Structure maintenance of chromosomes

Tw : Twist

UDG : Uracil DNA glycosylase

Wr : Writhe

I. INTRODUCTION

1. Le surenroulement de l'ADN

1.1 Définition

Le surenroulement de l'ADN peut être défini comme étant une des conformations qu'adopte l'ADN dans l'espace. Lorsque la double hélice d'ADN s'enroule autour d'elle même, elle forme des supertours et devient surenroulée. L'ADN peut se trouver dans plusieurs états distincts : (1) l'état relaxé, lorsque la double hélice ne possède aucun surenroulement; (2) l'état de surenroulement positif, lorsque le surenroulement se fait dans le sens de la rotation de la double hélice; et (3) l'état de surenroulement négatif, lorsque le surenroulement de l'ADN se fait dans le sens opposé par rapport à la rotation de la double hélice (figure 1 A et B). Chez la plupart des organismes vivants, l'ADN est dans un état surenroulé négatif, ce qui permet de condenser l'ADN et de faciliter l'ouverture des brins. Dans l'ensemble du texte qui suit, le terme ADN fait référence à l'ADN double brin.

1.2 Dynamique du surenroulement

L'ADN de forme circulaire se retrouve chez les bactéries et chez certains virus (Fiers et Sinsheimer, 1962; Weil et Vinograd, 1963). Cet ADN est souvent double brin, c'est-à-dire qu'il est composé de deux chaînes nucléotidiques antiparallèles. Chez les eucaryotes, l'enroulement de l'ADN autour de protéines histones et son organisation en domaines, contribuent à circulariser l'ADN dans ces organismes (section 3). La circularité de l'ADN peut être alors considérée comme un fait universel et un attribut essentiel d'un ADN actif. Cette circularité de l'ADN lui impose des contraintes particulières qui sont décrites dans l'équation de Vinograd et Lebowitz : $Lk = Tw + Wr$ (Vinograd et Lebowitz, 1966). Dans cette équation, le Lk représente le nombre de fois que les deux brins d'ADN se croisent et correspond à une constante. Le Tw (Twist) désigne la torsion d'un brin d'ADN autour de l'autre et est directement lié au pas de l'hélice, et le Wr (Writhe) constitue l'enroulement de la double hélice autour d'elle même, c'est-à-dire le surenroulement. D'après l'équation de Vinograd et Lebowitz, le degré de torsion de l'hélice et sa rotation autour d'elle-même influencent le nombre de fois que les deux brins d'ADN se croisent. L'ADN circulaire étant formé de deux brins d'ADN antiparallèles (Watson et Crick, 1953) liées entre eux de façon covalente, le nombre de fois que les deux brins se croisent (Lk) est donc une constante. Si par contre, un des deux brins d'ADN subit une coupure alors que l'autre reste circulaire, le

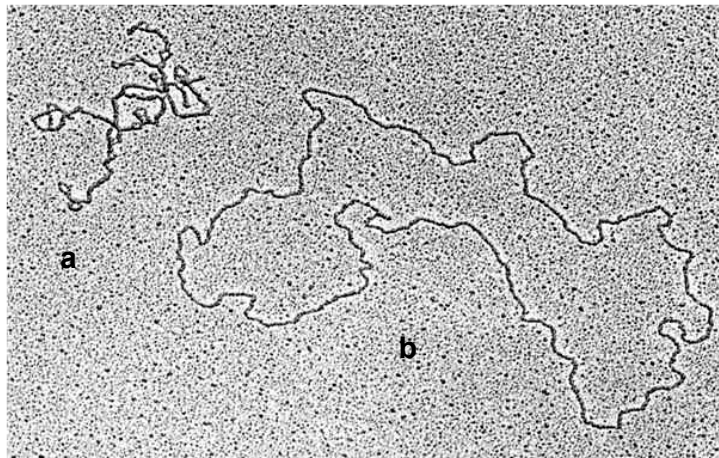
nombre de Lk pourrait alors changer. Puisque le Lk est fixe, ceci implique qu'un changement dans la torsion des hélices (Tw) affecte le Wr, de même qu'un changement dans le Wr ou le surenroulement affecte le Tw. En d'autres termes, l'ADN étant flexible, toute tension introduite dans celui-ci est capable de diffuser et de modifier sa structure selon l'équation $Lk = Tw + Wr$ (figure 2).

Contrairement à un ADN circulaire qui n'a pas d'extrémités libres, des tensions introduites dans un ADN linéaire peuvent être éliminées par une simple rotation des extrémités libres. En effet, un changement dans le nombre du Tw fait varier l'angle de rotation des nucléotides les uns par rapport aux autres et donc le pas de la double hélice. Cela se traduit tout naturellement par une rotation de l'ADN autour de lui-même, ainsi que par l'introduction de surenroulement. Inversement, un changement dans le Wr déclenche automatiquement une modification de la valeur du pas de l'hélice afin de conserver le nombre total de Lk constant (Benham et Mielke, 2005). Des coupures dans les brins d'ADN créeraient des extrémités libres, ce qui permettrait alors de modifier le nombre de Lk avant de circulariser à nouveau l'ADN. Ceci a pour conséquence l'introduction de tension dans l'ADN qui engendre du surenroulement (figure 2). Cette tâche est spécifique aux topoisomérases qui sont les seules enzymes de la cellule capables de changer le nombre de Lk en modifiant le surenroulement de l'ADN. Ainsi, selon l'équation $Lk = Tw + Wr$, un changement du Wr de -2 par les topoisomérases conduirait à une diminution du Lk de -2. Autrement dit, une introduction du surenroulement négatif dans l'ADN diminuerait le nombre de fois que les brins se croisent, ce qui favoriserait l'ouverture ou la séparation des brins d'ADN.

2. Les topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes capables de changer le surenroulement d'un ADN double brin en catalysant le passage d'un brin d'ADN à travers l'autre, ou de deux brins d'ADN à travers l'un et l'autre (Champoux, 2001; Wang, 1985). Les topoisomérases ont un rôle essentiel dans la réplication (Postow *et al.*, 2001), la transcription (Wu *et al.*, 1988), la recombinaison (Spell et Holm, 1994), le compactage de l'ADN et dans la ségrégation des chromosomes (Alexandrov *et al.*, 1999). On distingue deux types de topoisomérases, les topoisomérases I (IA et IB) et les topoisomérases II (IIA et IIB). Chez *Escherichia coli*, quatre topoisomérases ont été découvertes : la topoisomérase I et III de type IA, la gyrase et la topoisomérase IV appartenant au type IIA.

A



B

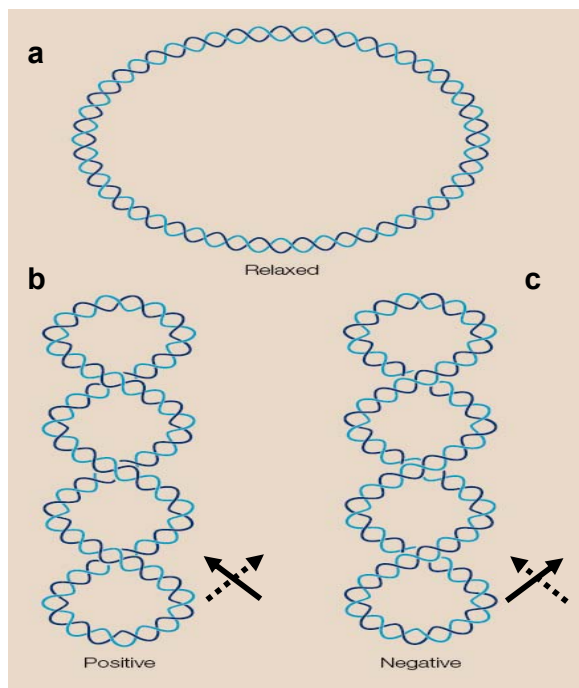


Figure 1 : Les différents états de surenroulement de l'ADN. (A) Photographie de plasmides observés par microscopie. En (a) l'ADN est surenroulé et en (b) l'ADN est relaxé. Sinden, 1994. (B) Schéma représentant l'ADN double brin dans un état (a) relaxé, (b) surenroulé positivement et (c) surenroulé négativement. Les flèches représentent le sens de rotation des brins d'ADN. La flèche pleine passant au-dessus de la flèche en pointillé, indique le sens du surenroulement. Lorsque les brins d'ADN se croisent dans le sens allant de la droite vers la gauche (b), l'ADN est surenroulé positivement. Inversement pour l'ADN surenroulé négativement (c). Travers et Muskhelishvili, 2005.

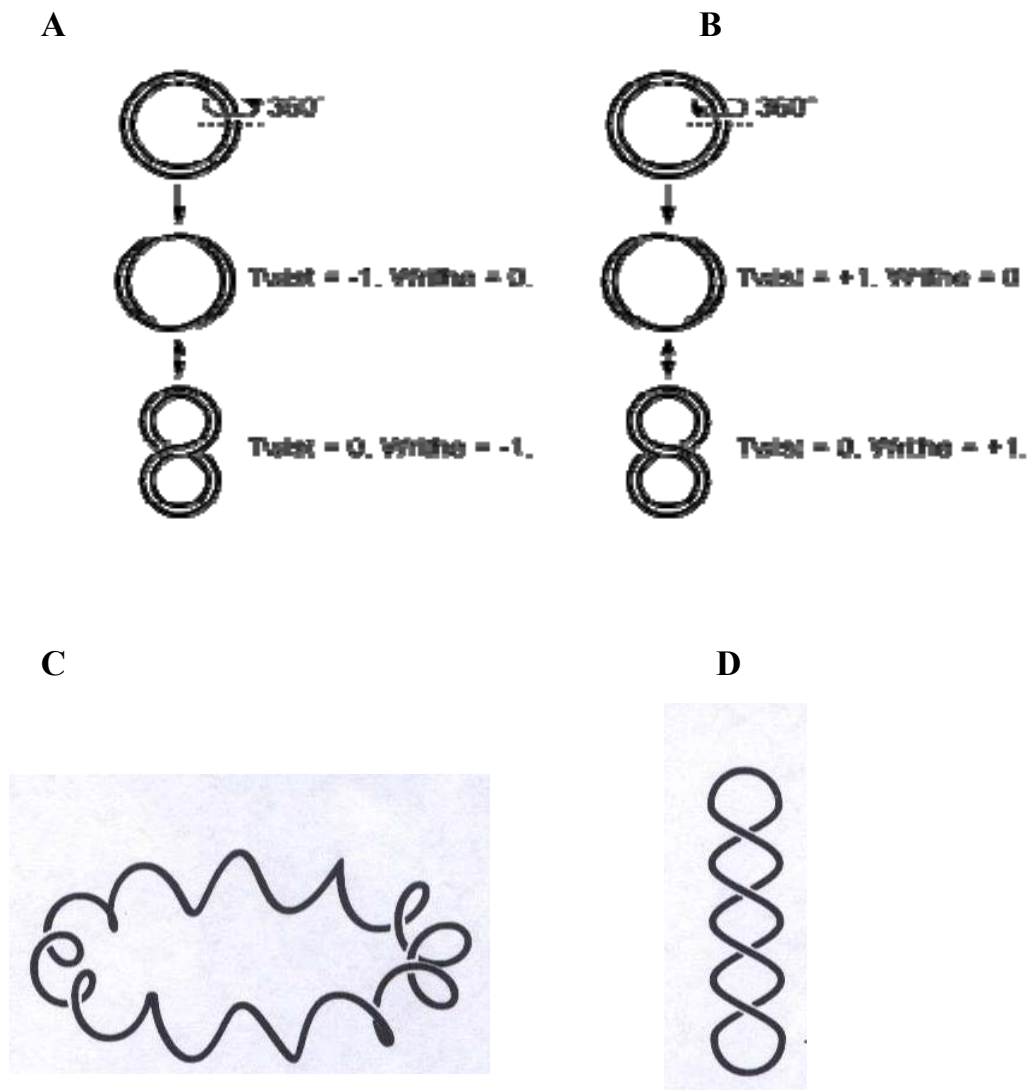


Figure 2: Relation entre la torsion (Twist) et le surenroulement (Writhe) de l'ADN. (A) Dans cet exemple, la double hélice d'ADN tourne de la droite vers la gauche, ce qui correspond à un ADN dit de type B. La rotation de l'ADN de 360° dans le sens négatif (de gauche vers la droite) introduit une torsion dans l'ADN qui se traduit par l'introduction d'un supertour négatif. **(B)** La rotation de l'ADN de 360° dans le sens positif (de droite à gauche) introduit une torsion dans l'ADN qui se traduit par l'introduction d'un supertour positif. **(C, D)** Deux formes possibles que peut prendre l'ADN surenroulé négativement. **(C)**, forme Solénoïde ou toroïdale de l'ADN qui s'enroule autour d'un axe circulaire. **(D)**, forme plectonémique de l'ADN qui s'enroule sur lui-même autour de son axe central. Cozzarelli et Wang, 1990.

2.1 Les topoisomérases de types IA

Les topoisomérases de type IA ont la particularité de couper un des deux brins d'ADN tout en restant attachées à une extrémité du brin coupé (Wang, 1996; Champoux, 2001; Champoux 2002). Ces enzymes établissent une liaison phosphodiester entre la tyrosine de leur site actif et l'extrémité en 5' phosphate de l'ADN, laissant l'extrémité 3' OH du brin coupé libre. Les topoisomérases de type IB font l'inverse, c'est-à-dire qu'elles établissent une liaison phosphodiester en 3' OH de l'ADN, laissant libre l'extrémité 5' phosphate. Les topoisomérases de types IA font le passage du brin d'ADN intact à travers la coupure créée sur l'autre brin, contrairement aux types IB qui font une rotation du brin coupé autour du brin intact. À l'exception de la reverse gyrase, dont la partie topoisomérase est fusionnée à une hélicase, et de la topoisomérase V dont la partie topoisomérase est fusionnée à une protéine de réparation de l'ADN, toutes les topoisomérases de type IA sont monomériques et ne requièrent pas de molécules d'ATP pour leur activité. Par contre, toutes les topoisomérases de type IA ont besoin de la présence du co-facteur Mg^{2+} pour leur activité (Viard et de la Tour, 2006).

Les topoisomérases de type IA reconnaissent une région d'ADN simple brin proche d'une région d'ADN double brin (Kirkegaard and Wang, 1985), une structure conséquence de la présence de surenroulement négatif (section 1.2). Ainsi, les topoisomérases de type IA ont la particularité de relaxer le surenroulement négatif plutôt que le surenroulement positif. Ces protéines possèdent également la capacité de former ou de défaire des nœuds dans l'ADN, de caténer ou de décaténer des duplexes d'ADN (Brown et Cozzarelli, 1981). L'élimination et la formation de nœuds ont lieu lorsque la coupure et le passage des brins d'ADN se font à l'intérieur de la même molécule, alors que la caténation et la décaténation ont lieu lorsque le même événement arrive entre deux molécules d'ADN différentes (Forterre *et al.*, 2007; figure 3).

2.1.1 La topoisomérase I bactérienne

Codée par le gène *topA* (Wang, 1971; Trucksis et Depew, 1981), la topoisomérase I a une structure en pince de crabe, au centre de laquelle se trouve une ouverture chargée positivement pouvant accommoder les deux brins d'ADN (Champoux, 2001, figure 4). Dans cette ouverture se trouve une tyrosine dont l'oxygène est capable de former une liaison

covalente avec un phosphate de l'ADN, et de cliver ce phosphate en position 5'. En tenant chaque côté du brin coupé, l'enzyme fait passer le brin intact à travers la coupure et relie ensuite les deux bouts du brin coupé. Le résultat de cette manœuvre est l'élimination d'un tour négatif suivi tout naturellement par un changement de nombre du Lk de +1 (Wang, 1996; Champoux, 2001, figure 5).

En collaboration avec la gyrase, la topoisomérase I régule le niveau de surenroulement de l'ADN et le maintient autour d'une moyenne favorable à la croissance bactérienne (Drlica, 1992, section 2.3). Dans des cellules déficientes en topoisomérase I, la croissance est inhibée (Drolet *et al.*, 1995) et l'ADN de la cellule est excessivement surenroulé négativement (Pruss *et al.*, 1982; Massé et Drolet, 1999a). Pour diminuer cette accumulation du surenroulement négatif, ces cellules ont tendance à accumuler des mutations compensatoires dans les sous-unités GyrA ou GyrB de la gyrase, rendant cette enzyme moins efficace pour introduire du surenroulement négatif (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982; Hammond *et al.*, 1991). Dans des cellules déficientes en topoisomérase I, on observe également la présence d'ADN plasmidique hypersurenroulé négativement directement lié à la formation d'hybrides ARN/ADN ou R-loops (Drolet *et al.*, 1994). L'hypersurenroulement négatif est une forme d'ADN excessivement surenroulée négativement de telle sorte que des intercalateurs d'ADN n'ont plus d'effet sur sa résolution à travers un gel d'agarose. En absence de topoisomérase I, la surproduction de la RNase HI, une enzyme qui dégrade l'ARN d'un R-loop, est capable d'éliminer cet hypersurenroulement négatif et de rétablir la croissance (Massé et Drolet, 1999a; Drolet *et al.*, 1995). Le rôle majeur de la topoisomérase I est donc de prévenir la formation de R-loops en relaxant le surenroulement négatif (Massé et Drolet, 1999). Ce lien entre la formation de R-loop et la topoisomérase I est appuyé par le fait qu'une délétion de la RNase HI est létale pour mutant déficient en topoisomérase I (Drolet *et al.*, 1995).

La topoisomérase I est souvent localisée au niveau de gènes fortement transcrits (Drolet *et al.*, 1994), et elle interagit avec la partie C-terminale de l'ARN polymérase d'*E. coli* (Cheng *et al.*, 2003a). Comme telle, elle pourrait être considérée comme un facteur important de la transcription. Il semble que l'interaction physique entre l'ARN polymérase et la topoisomérase I permet la localisation de cette dernière au niveau des gènes transcrits.

La topoisomérase I est également impliquée dans l'adaptation des bactéries aux stress. Des délétions dans les promoteurs du gène *topA* ou l'inactivation de la topoisomérase I rendent les cellules sensibles aux stress de hautes températures et oxydatifs (Qi *et al.*, 1996; Qi *et al.*,

1999; Tse-Dinh, 2000). La transcription du gène *topA* est régulée à partir de quatre promoteurs. Son niveau cellulaire est maintenu constant peu importe les phases et les conditions du milieu de croissance (Rui et Tse-Dinh, 2003, figure 6). Parmi les quatre promoteurs identifiés pour le gène *topA*, les promoteurs P2 et P4 sont reconnus par le facteur sigma 70 et permettent l'expression de *topA* durant la phase de croissance exponentielle, le promoteur Px1 est reconnu par le facteur sigma S et favorise l'expression de *topA* durant la phase stationnaire et durant divers stress (Qi *et al.*; 1997), et le promoteur P1 est reconnu par le facteur sigma 32 qui facilite l'expression de *topA* pendant l'adaptation aux stress de hautes températures (Lesley *et al.*; 1990). Le rôle de la topoisomérase I durant les stress semble être directement lié à l'inhibition de la formation de R-loops (Cheng *et al.*; 2003a). Lors d'un stress de haute température ou oxydatif, l'expression des gènes de résistance est inhibée en absence de topoisomérase I, et la survie de ces cellules est négativement affectée. La surproduction de la RNase HI corrige les défauts d'expression de ces gènes de résistance et améliore la survie de ces cellules (Cheng *et al.*; 2003b).

2.1.2 La topoisomérase III

La topoisomérase III est codée par le gène *topB* (Digate et Mariani, 1988; Digate et Mariani, 1989) et possède une structure homologue à celle de la topoisomérase I (Wang, 1996; Champoux, 2001, figure 4). *In vitro*, la topoisomérase III ne relaxe pas bien le surenroulement négatif, elle est surtout très efficace pour la décaténation des duplexes d'ADN (Digate et Mariani, 1988). La différence majeure entre la topoisomérase I et la topoisomérase III est que cette dernière nécessite un ADN simple brin stable pour relaxer le surenroulement négatif. Ceci expliquerait pourquoi la topoisomérase III est très efficace pour relaxer le surenroulement négatif à haute température (Champoux, 2001). Avec l'aide de l'hélicase RecQ, la topoisomérase III est capable de caténer l'ADN double brin *in vitro* et de résoudre des précaténats *in vitro* et *in vivo* (Harmon *et al.*, 1999; Nurse *et al.*; 2003). Les données obtenues à partir d'expériences réalisées *in vitro* suggèrent un rôle important de la topoisomérase III dans la réplication. Pourtant, il en est tout autrement *in vivo*. En effet, la topoisomérase III est beaucoup moins efficace que la topoisomérase IV pour décaténer les duplexes ADN issues de la réplication. La perte de la topoisomérase III n'entraîne aucune accumulation de précaténanes dans les cellules, comparativement à l'absence de topoisomérase IV (Lopez *et al.*, 2005).

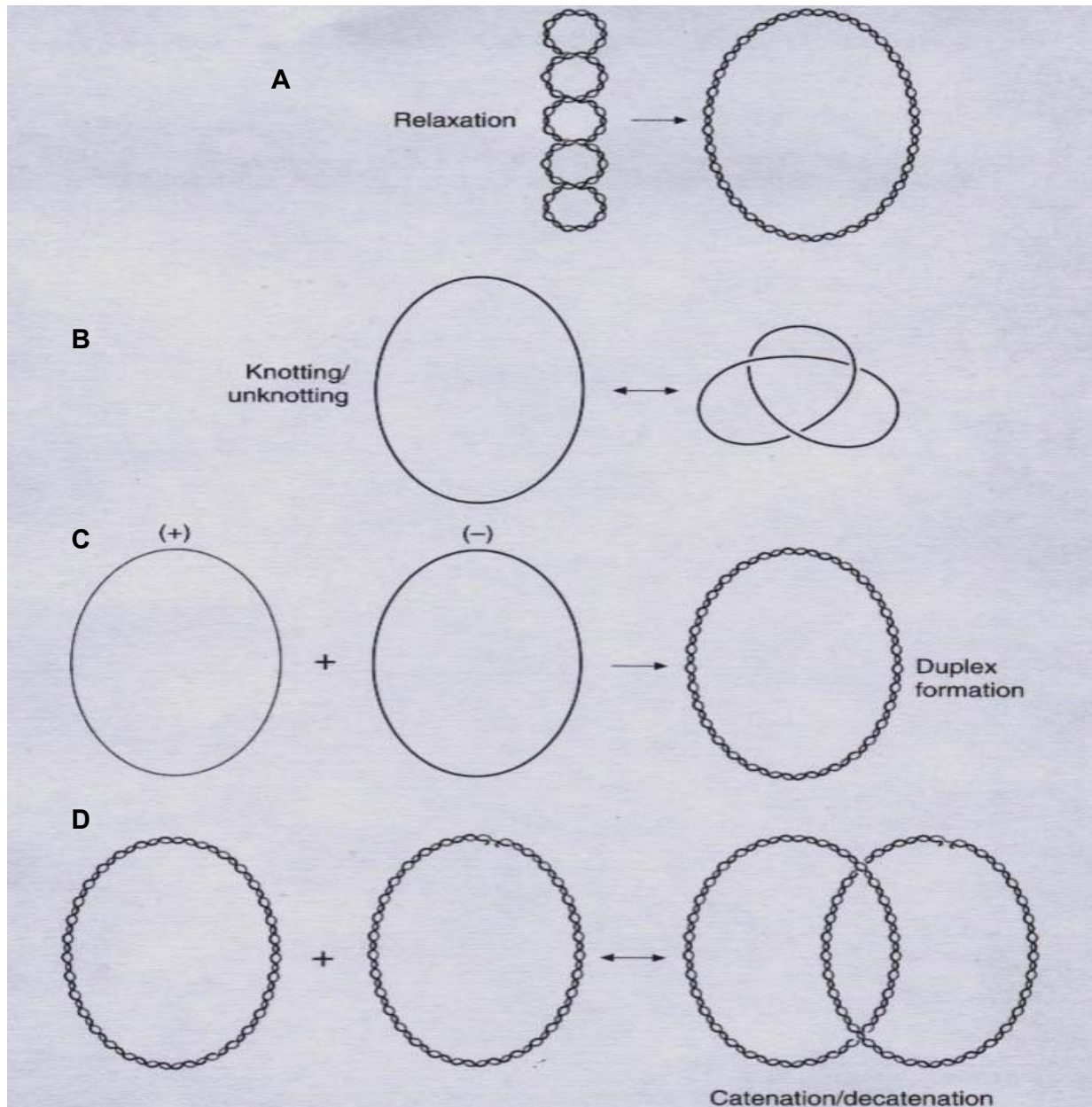
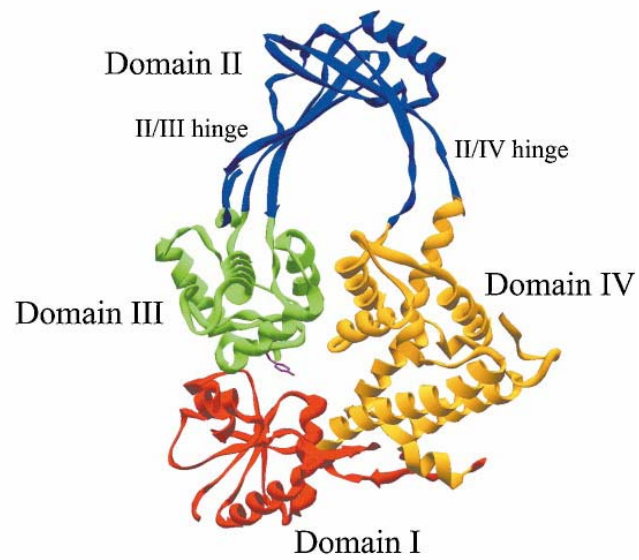
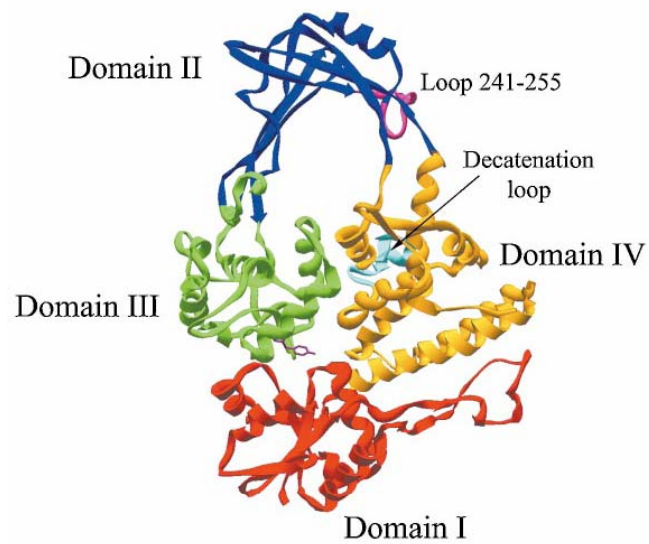


Figure 3 : Les différentes activités des topoisomérases de type I. **(A)** Relaxer le surenroulement dans l'ADN. **(B)** Faire ou défaire des nœuds. **(C)** Formation de duplexes d'ADN à partir de deux ADN simple brin complémentaires. **(D)** Caténation et décaténation de deux molécules d'ADN. Bates et Maxwell, 1993.

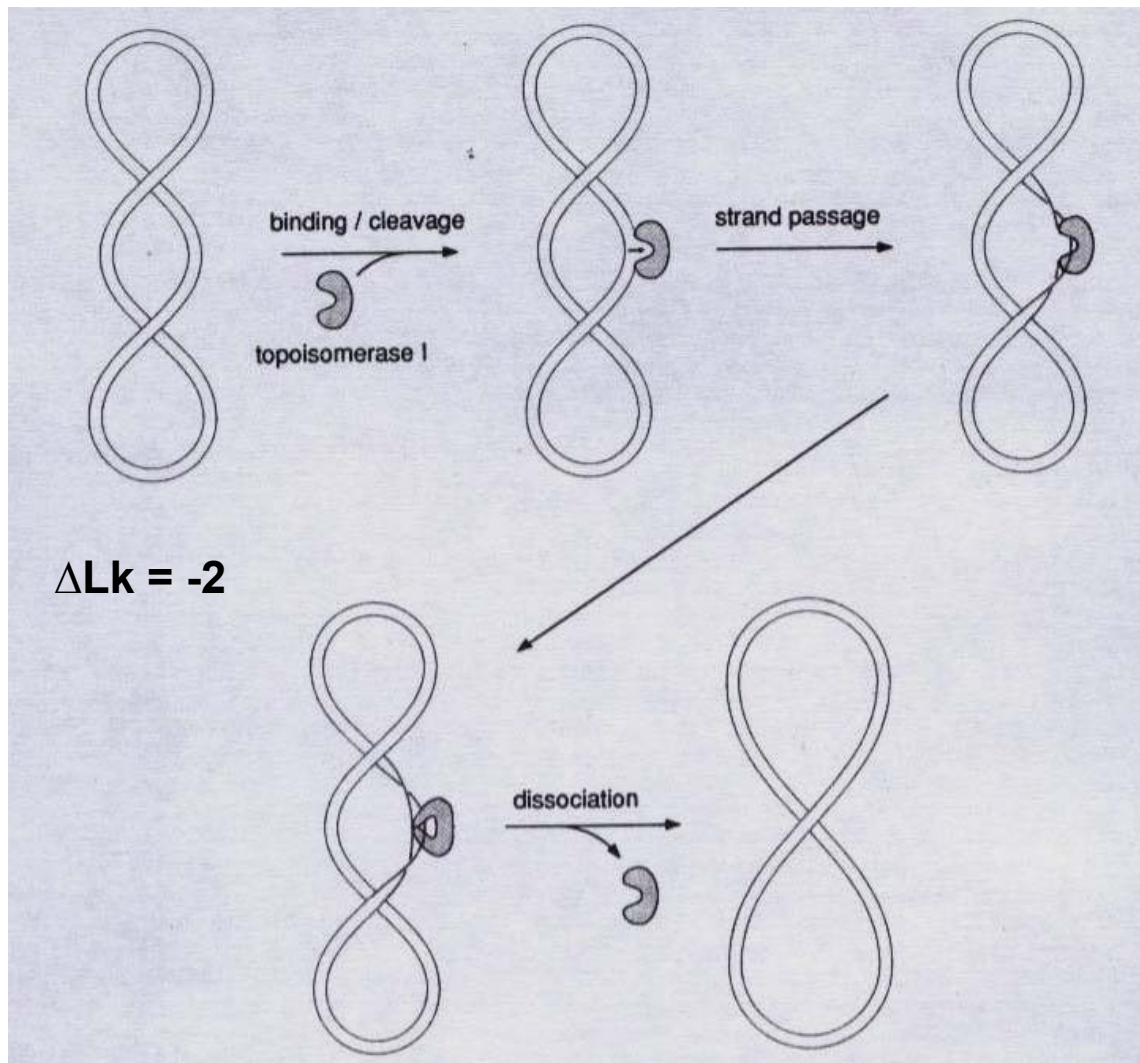


Topoisomérase I.



Topoisomérase III.

Figure 4 : Structure de la topoisomérase I et de la topoisomérase III bactérienne.
Champoux, 2001.



$\Delta Lk = -2$

$\Delta Lk = -1$

Figure 5 : Mécanisme d'action de la topoisomérase I bactérienne. La topoisomérase I se lie à l'ADN, coupe un des brins d'ADN, fait passer le brin d'ADN intact à travers la coupure créée par l'autre brin puis relie le brin coupé. Cette gymnastique réalisée par la topoisomérase I permet l'élimination d'un supertour négatif. Blates et Maxwell 1993.

Lorsqu'elle est surproduite *in vivo*, la topoisomérase III peut compléter l'absence de topoisomérase I (Broccoli *et al.*, 2000) ou encore se substituer à la topoisomérase IV (Nurse *et al.*, 2003; Hiasa et Mariani, 1994a).

L'association de la topoisomérase III avec l'hélicase RecQ suggère que cette enzyme est impliquée dans la recombinaison et dans la stabilité du génome (Oakley et Hickson, 2002). Il semblerait que lors de la recombinaison, l'hélicase RecQ produit des substrats qui requièrent l'action de la topoisomérase III. La topoisomérase III prévient l'accumulation d'intermédiaires de recombinaisons qui peuvent être dommageables pour les cellules (Harmon *et al.*, 1999). Une étude génétique montre que la topoisomérase III est requise pour la ségrégation des chromosomes après la recombinaison homologue (Zhu *et al.*, 2001). La topoisomérase III serait en effet capable de résoudre les intermédiaires de recombinaison suite à l'action de RecQ et de RecA, prévenant ainsi des réarrangements géniques par la voie de RuvABC (Lopez *et al.*, 2005). Plusieurs autres évidences chez les eucaryotes démontrent aussi que la topoisomérase III joue un rôle important dans la recombinaison. Chez *Sacharomyces cerevisiae*, l'absence de topoisomérase III cause des aberrations chromosomiques et la délétion de TOP3 α chez la souris écourte sa vie, la rend infertile et cause la mortalité de ses embryons (Wallis *et al.*, 1989; Kwan et Wang, 2001; Kwan *et al.*, 2003; Li et Wang, 1998). Chez *E. coli*, une délétion de topoisomérase III engendre un taux élevé de recombinaison RecA dépendante (Schofield *et al.*, 1992), mais les cellules sont viables et n'ont aucun défaut de croissance (Digate et Mariani, 1989). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la topoisomérase I qui est présente dans ces cellules compenserait pour l'absence de topoisomérase III. Chez *E. coli*, une double délétion de topoisomérase I et III engendre un défaut de ségrégation des chromosomes ainsi que la filamentation des cellules (Zhu *et al.*, 2001). Ce phénotype est corrigé par une délétion du gène *recA* démontrant le rôle de la topoisomérase III dans la recombinaison (Zhu *et al.*, 2001).

La surproduction de la topoisomérase III chez *E. coli* complète l'absence de topoisomérase I suggérant qu'à cette concentration élevée, la topoisomérase III est susceptible d'éliminer un R-loop ou de relaxer le surenroulement négatif (Broccoli *et al.*, 2000). Il semble que sa faible concentration cellulaire et son association avec la protéine RecQ déterminent tout deux son rôle dans la recombinaison. Lorsqu'elle est présente en plus grand nombre, la topoisomérase III pourrait alors intervenir dans la recombinaison, dans la régulation du surenroulement négatif et dans l'élimination des R-loops.

2.2 Les topoisomérases de type IIA

Enzymes multimériques, les topoisomérases II coupent deux brins d'ADN à la fois et font le passage d'un ADN double-brin intact à proximité, à travers la coupure créée (Mizuuchi *et al.*, 1980; Wang, 2002; Champoux, 2001; figure 7). Comme c'est le cas pour les topoisomérases de type IA, ces enzymes établissent des liens phosphotyrosines en 5' de l'ADN avant de couper les deux brins d'ADN. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet un changement de conformation de l'enzyme et le passage de l'ADN intact avant qu'il n'y ait une ligation des extrémités coupées. La présence du cofacteur Mg^{2+} est requise pour l'activité de ces enzymes. Les topoisomérases II peuvent caténer ou décaténer l'ADN (Steck et Drlica, 1984; Bliska et Cozzarelli, 1987), créer ou enlever des nœuds dans l'ADN (Zechiedrich *et al.*, 1997; Zechiedrich et Cozzarelli, 1995) et relaxer aussi bien le surenroulement positif que négatif (Wang, 1996, figure 7). Les topoisomérases II sont des enzymes essentielles pour la cellule. C'est pour cette raison qu'elles sont la cible de composés antibiotiques et anticancers. Les topoisomérases II sont divisées en deux groupes : les topoisomérases de type IIA et IIB. Les topoisomérases de type IIA sont des homodimères chez les eucaryotes et des hétérotétramères chez les bactéries, alors que les topoisomérases de type IIB sont multimériques chez tous les organismes qui en possèdent. Chez *E. coli*, les deux topoisomérases II sont de type IIA : la gyrase et la topoisomérase IV.

2.2.1 La gyrase

Cette enzyme est constituée des sous-unités GyrA et GyrB codées respectivement par les gènes *gyrA* et *gyrB* (Gellert *et al.*, 1976). La sous-unité GyrA est responsable de la liaison à l'ADN, de la coupure et de la ligation, alors que la sous-unité GyrB est plutôt responsable de l'hydrolyse de l'ATP (Wang, 1996). Le ratio ATP/ADP qui reflète le niveau d'énergie disponible dans la cellule détermine l'activité de la gyrase. En présence d'un excès d'ATP, la gyrase introduit du surenroulement négatif et lorsqu'il manque de l'ATP, elle relaxe le surenroulement négatif. En présence d'ATP, le résultat de son action est donc l'introduction de deux supertours négatifs suivi du changement du nombre de Lk de -2 (Brown et Cozzarelli, 1979, figure 8). Cette enzyme a pour substrat des régions d'ADN double brin de tours positifs et est la seule topoisomérase capable de surenrouler négativement un ADN circulaire. Le rôle principal de la gyrase est donc d'introduire du surenroulement négatif dans l'ADN, ce qui

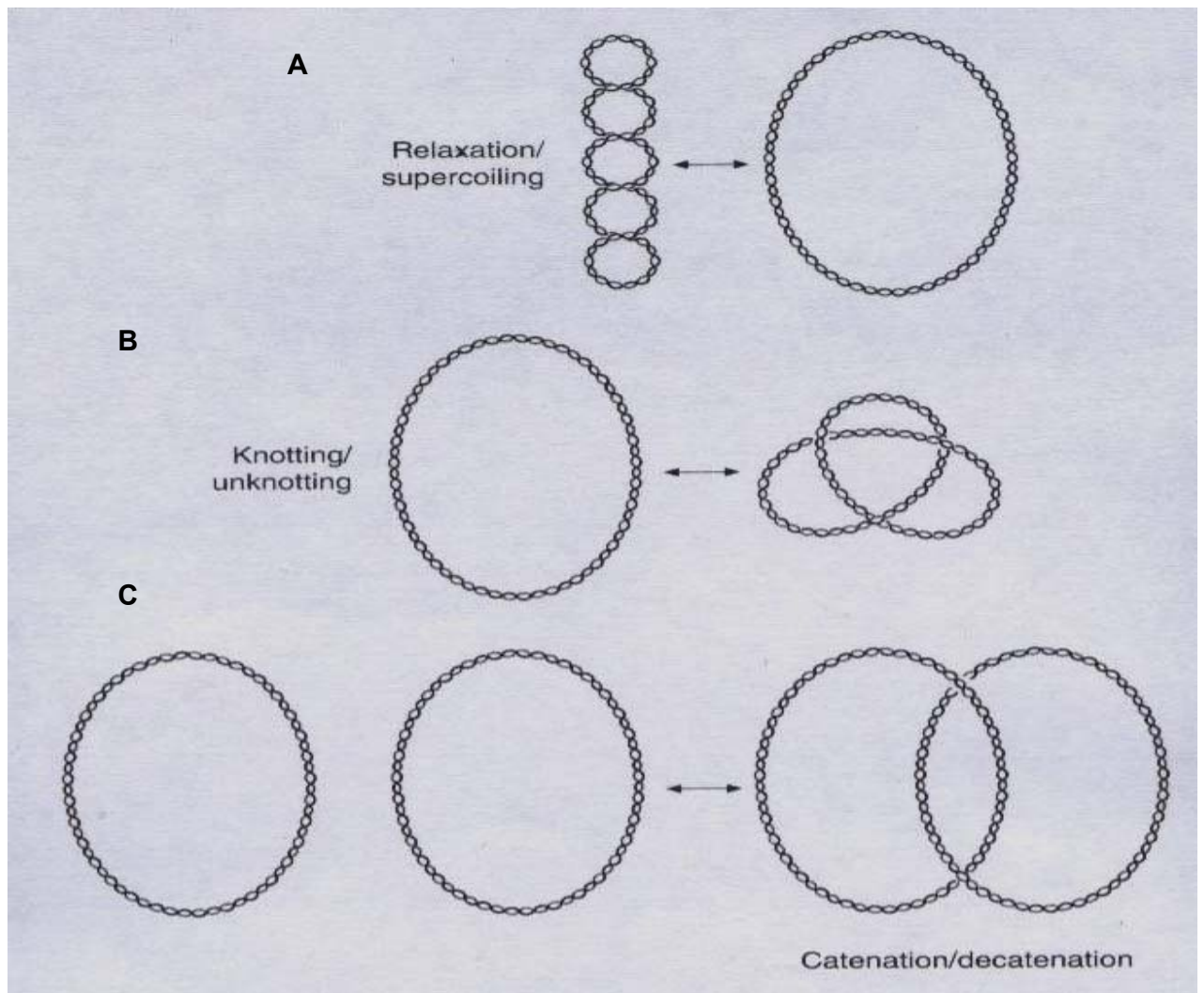


Figure 7 : Les différentes activités des topoisomérase de type II. (A) Relaxer et introduire du surenroulement dans l'ADN. **(B)** Faire ou défaire des nœuds. **(C)** Caténer et décaténer l'ADN. Bates et Maxwell, 1993.

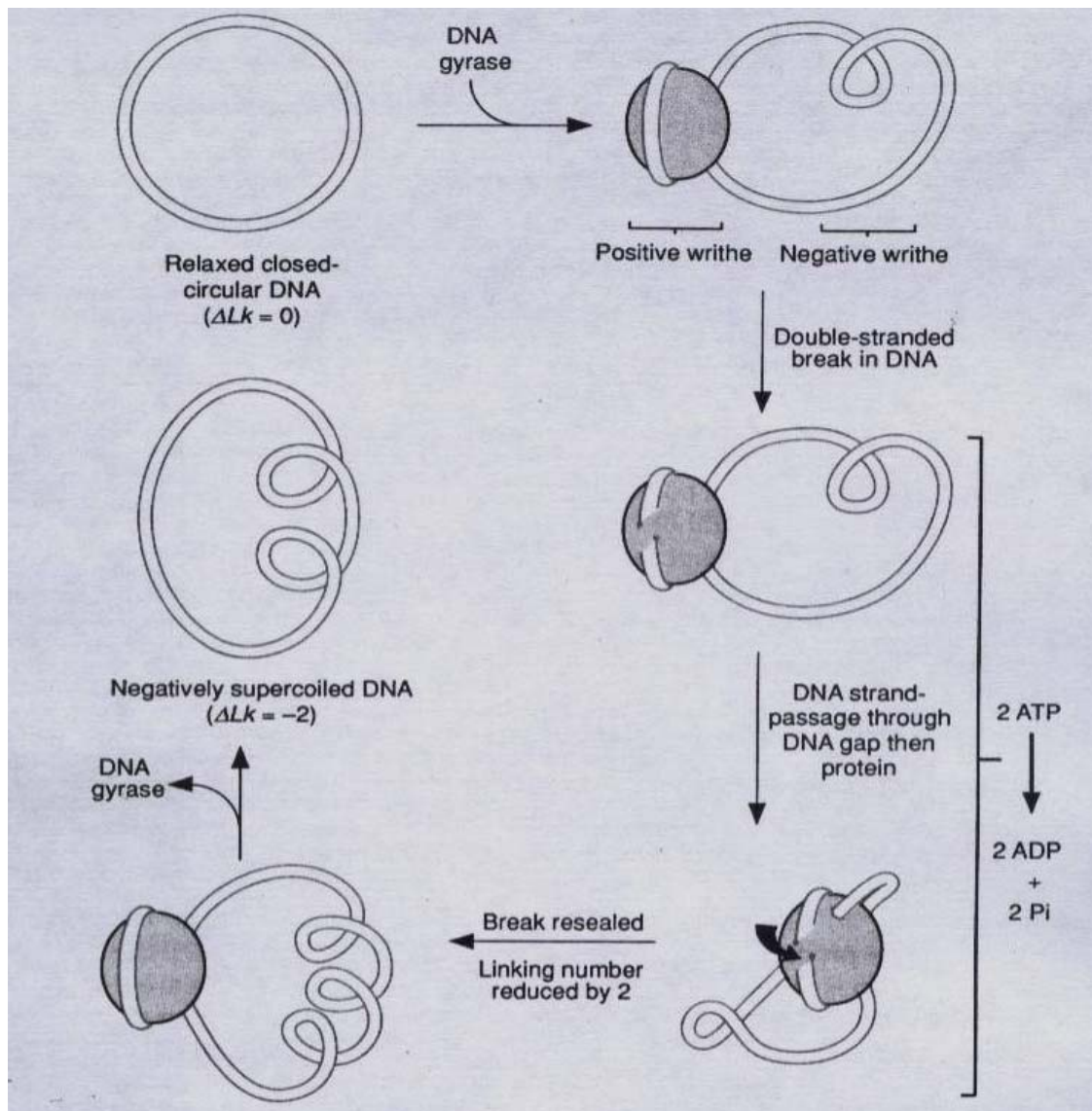


Figure 8 : Mode d'action de la gyrase. En se liant à l'ADN, la gyrase stabilise un supertour positif, ce qui a pour conséquence la formation de supertours négatifs ailleurs sur l'ADN. L'ADN double brin enroulé autour de la gyrase est alors coupé. Tout en restant liée aux deux brins coupés, la gyrase fait le passage d'un autre segment d'ADN intact à travers l'ouverture créée par la coupure. Par la suite, la gyrase relie les brins coupés entre eux. Le résultat de cette manœuvre est l'introduction de deux supertours négatifs et le changement du Lk de -2 ($\Delta Lk = -2$). L'activité catalytique de la gyrase requiert l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Bates et Maxwell, 1993.

favorise la séparation des brins d'ADN et permet l'initiation de la réplication et de la transcription.

Pendant la phase d'élongation de la réplication et de la transcription, la gyrase est requise car elle relaxe le surenroulement positif généré par la progression des complexes enzymatiques (Khodursky *et al.*, 2000). La délétion d'une des sous-unités de la gyrase ou l'inhibition de l'activité de la gyrase est létale. Le chromosome devient en effet trop relaxé et les cellules sont non viables (Drlica et Snyder, 1978; Lockshon et Morris, 1983; Steck *et al.*, 1984). C'est pour cela que la gyrase est la cible de nombreux antibiotiques dérivés des quinolones et des coumarines (Snyder et Drlica, 1979; Heddle *et al.*, 2001). Les quinolones provoquent la mort cellulaire en causant la fragmentation du chromosome suite à l'inhibition de l'étape de ligation par la gyrase.

2.2.2 La topoisomérase IV

La topoisomérase IV est un hétérotétramère composé de deux unités Par-C et Par-E codées respectivement par les gènes *parC* et *parE* (Kato *et al.*, 1992). Ces deux sous-unités sont homologues aux sous-unités GyrA et GyrB de la gyrase et sont donc sensibles aux mêmes inhibiteurs de la famille des coumarines et des quinolones (Peng et Mariani, 1993). La grande différence entre la gyrase et la topoisomérase IV est que cette dernière ne peut introduire du surenroulement négatif car elle ne peut enrouler l'ADN autour de sa structure C-terminal (Kampranis et Maxwell, 1996; Hsieh *et al.*, 2004).

In vitro, la topoisomérase IV est capable de relaxer le surenroulement négatif et positif. Elle possède cependant une meilleure activité de relaxation du surenroulement positif (Crisona *et al.*, 2000). *In vivo*, cette enzyme joue un rôle majeur dans la résolution des caténères et dans la ségrégation des chromosomes après la réplication (Zecheidrich et Cozzarelli, 1995; Ullsperger et Cozzarelli, 1996). En effet, la topoisomérase IV interagit avec la protéine membranaire FtsK (Espeli *et al.*, 2003) et les séquences *dif* sur le chromosome (Barre *et al.*, 2001; Aussel *et al.*, 2002), tous deux intervenant avec XerC et XerD dans la résolution des dimères issues de la réplication (Lesterlin *et al.*, 2004). Durant la réplication, elle est surtout impliquée dans le dénouement des précatéanes mais elle peut aussi aider la gyrase à relaxer les supertours positifs (Khodursky *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 1992; Espeli et Mariani, 2004). Un précatéane est un supertour positif qui se forme dans la région d'ADN répliquée et qui

ressemble à un caténane. Il peut se former par diffusion vers l'arrière des tensions positives accumulées en avant de l'ADN polymérase en déplacement. Il semble que la concentration cellulaire de la topoisomérase IV ainsi que son interaction avec FtsK et les séquences *dif* influencent grandement son rôle dans la ségrégation des chromosomes (Espeli *et al.*, 2003).

2.3 La régulation du surenroulement de l'ADN

Grâce à une régulation homéostatique effectuée par l'activité antagoniste de la gyrase et de la topoisomérase I, le niveau de surenroulement de l'ADN est maintenu autour d'une valeur moyenne favorable à la croissance (Drlica, 1992, Menzel et Gellert, 1983, figure 9). Dans une moindre mesure, la topoisomérase IV participe aussi à cette régulation (Zechiedrich *et al.*, 2000). Le rôle principal de la gyrase est d'introduire du surenroulement négatif (Cozzarelli, 1980), alors que le rôle critique de la topoisomérase I est d'empêcher que ce surenroulement négatif n'atteigne un niveau inapproprié (Drlica, 1990). Des évidences génétiques soutiennent ce principe. Premièrement, l'inactivation du gène *topA* engendre des mutations compensatoires dans les gènes *gyrB* ou *gyrA* qui diminuent la capacité de la gyrase à introduire du surenroulement négatif (Pruss *et al.*, 1982; Hammond *et al.*, 1991); et, deuxièmement, la duplication des locis *parC* et de *parE* sur le chromosome induit une surproduction de la topoisomérase IV qui complémente l'absence de la topoisomérase I (Kato *et al.*, 1990).

Le niveau de surenroulement peut varier entre les différentes phases de croissance et selon les conditions du milieu (Balke et Gralla, 1987). Parmi les éléments qui interviennent dans ces changements, il faut mentionner l'activité métabolique de la cellule représentée par le ratio ATP/ADP (Hsieh *et al.*, 1991), le taux de réplication et de transcription, ainsi que l'effet de facteurs physico-chimiques sur la topologie de l'ADN. Les fluctuations du surenroulement de l'ADN qui surviennent change le niveau de surenroulement et créent des substrats pour la topoisomérases I et la gyrase. Le changement du surenroulement dans l'ADN influence l'expression génique et l'abondance cellulaire de ces deux topoisomérases. Les promoteurs des gènes *gyrA* et *gyrB* sont effectivement activés lorsque le surenroulement négatif de l'ADN est relaxé (Menzel et Gellert, 1987), et ceux du gène *topA* sont stimulés lorsque l'ADN est surenroulé négativement (Tse-Dinh et Beran, 1988). L'activité métabolique représentée par la concentration cellulaire d'ATP influence directement l'activité de la gyrase qui agit sur le

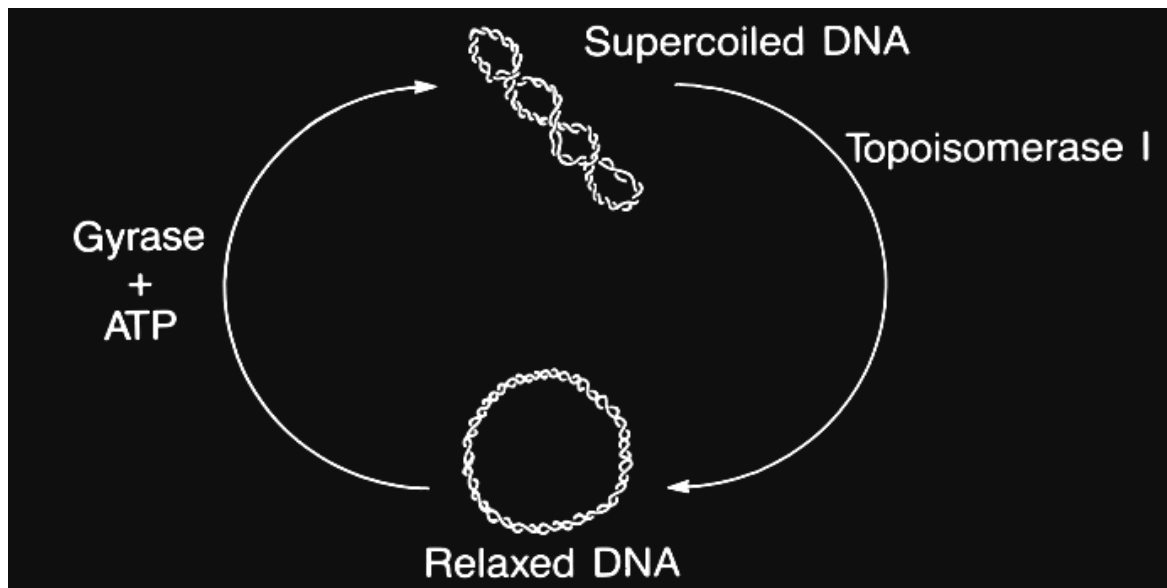


Figure 9 : La régulation du surenroulement de l'ADN par les activités antagonistes de la gyrase et la topoisomérase I. Chez *E. coli*, la gyrase introduit du surenroulement négatif en consommant une molécule d'ATP et la topoisomérase I relaxe ce surenroulement négatif. Drlica, 1992.

niveau de surenroulement de l'ADN. Les changements dans les conditions de croissance influencent le niveau de surenroulement via l'action de la topoisomérase I. En effet, l'activité des promoteurs du gène *topA* est régulée par différents facteurs sigma exprimés spécifiquement selon les différentes conditions de croissance (Rui et Tse-Dinh, 2003). Chez les bactéries, 50 % de l'ADN est sous forme contrainte à cause de son association à des protéines. Chez ces organismes, le surenroulement présent dans cet ADN sous forme contrainte est donc influencé par les niveaux et la distribution cellulaire de ces différentes protéines (section 3).

3. Organisation de l'ADN chez les procaryotes

L'ADN de tous les organismes vivants est sous une forme compacte (Thanbichler *et al.*, 2005), ce qui permet son inclusion dans la cellule ainsi que sa partition entre deux cellules filles après réplication (Holmes et Cozzarelli, 2000; Sawitzke et Austin, 2000). L'ADN chromosomique est compacté par le surenroulement ce qui consiste à enrouler la double hélice autour d'elle-même (section 1). Chez les eucaryotes, l'ADN s'enroule autour de protéines histones alors que chez les procaryotes, une partie de cet ADN surenroulé est associée à diverses protéines alors que l'autre partie est libre (Bliska et Cozzarelli, 1987, section qui suit).

L'ADN surenroulé et associé à des protéines est dit « contraint » car ces protéines empêchent la libre diffusion du surenroulement. Les premières images du chromosome bactérien obtenues par microscopie électronique nous montrent un ADN en forme de rosette, c'est-à-dire des boucles d'ADN rattachées à une structure centrale (Kavenoff et Bowen, 1976; figure 10). Créées par le surenroulement, ces boucles d'ADN appelées domaines sont en fait des unités topologiques indépendantes les unes des autres (Worcel et Burgi, 1972; Sinden et Pettijohn, 1981). Des barrières physiques qui existent à la base de ces domaines empêchent la diffusion du surenroulement car le bris d'une liaison phosphodiester à l'intérieur d'un domaine ne relaxe pas les domaines adjacents (Delius et Worcel, 1974). Les travaux les plus récents montrent que ces domaines ont une taille moyenne de 10 kb et qu'ils peuvent être aussi nombreux que quatre cents. Ils sont également distribués de façon stochastique chez *E. coli* (distribution statistique aléatoire) (Higgins *et al.*, 1996; Postow *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2005).

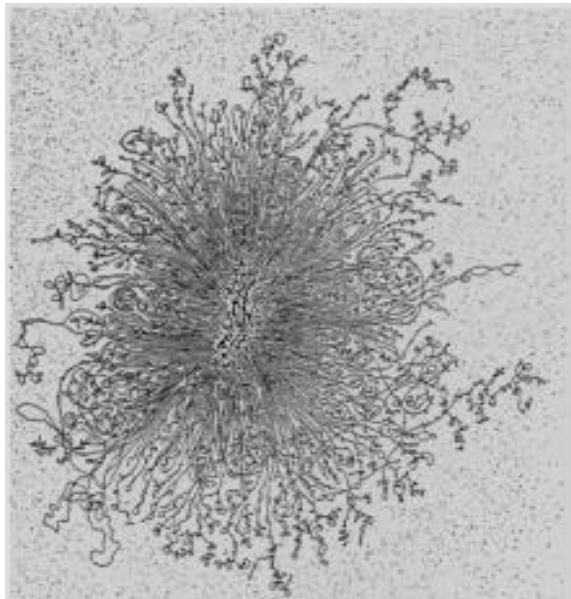
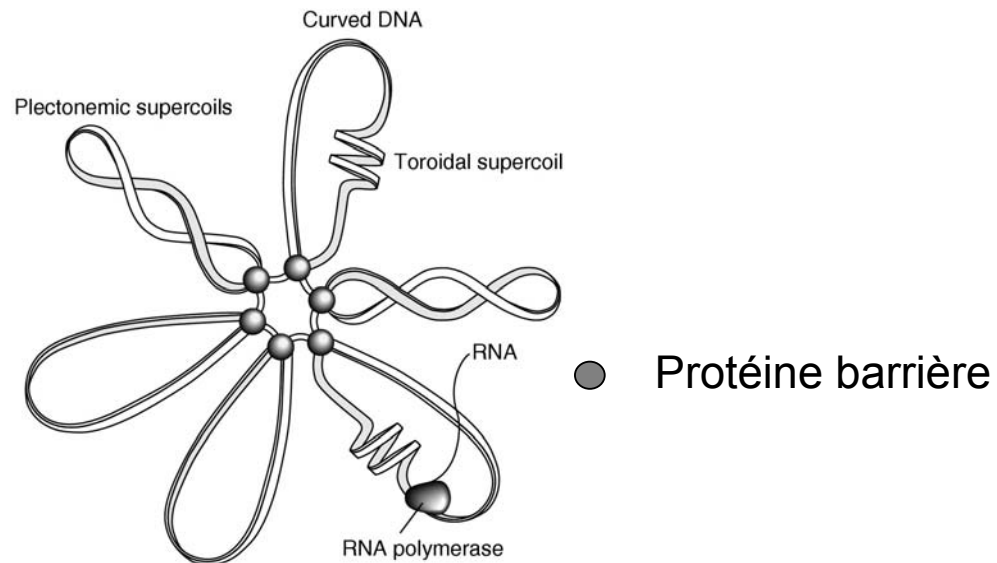
A**B**

Figure 10 : L'organisation de l'ADN chromosomique en domaines. **(A)** Photographie du chromosome d'*E.coli* observé au microscope et montrant l'organisation de l'ADN en domaines de surenroulement. Kavenoff et Bowen, 1976. **(B)** Illustration des domaines et de leurs barrières. Dans les domaines, l'ADN surenroulé peut être sous une forme plectonémique, toroidale ou pliée. L'activité transcriptionnelle introduit du surenroulement dans l'ADN et influence la formation des domaines.

3.1 Les facteurs impliqués dans l'organisation de l'ADN chromosomique

L'organisation de l'ADN en domaines est directement influencée par son association avec plusieurs protéines et par les activités de réplication et de transcription.

3.1.1 La gyrase

Chez *E. coli*, la gyrase constitue une des protéines majeures impliquées dans la formation des domaines. Cette enzyme se retrouve à la base des domaines et est la seule topoisomérase capable d'introduire du surenroulement négatif dans un ADN circulaire. Lorsque son activité est bloquée par un inhibiteur, la formation des domaines de surenroulement est fortement inhibée (Hsu *et al.*, 2006). En introduisant du surenroulement négatif dans l'ADN, elle permet non seulement la création des domaines mais permet aussi la condensation de l'ADN. Les trois autres topoisomérases d'*E. coli*, la topoisomérase I, III et IV, ne sont pas directement impliquées dans l'organisation du chromosome en domaines. Mais, puisqu'elles ont la capacité de modifier la conformation de l'ADN, elles influencent indirectement son organisation. En effet, la topoisomérase I est chargée d'éliminer l'excès de surenroulement négatif lors de la transcription (Massé et Drolet, 1999a), alors que les topoisomérases III et IV sont plutôt chargées de dénouer les structures entremêlées dans l'ADN et d'éliminer les tensions après la réplication (Espeli et Mariani, 2004). Dans la zone d'ADN non contraint, c'est-à-dire qui n'est pas associée à des protéines, la diffusion du surenroulement peut être bloquée par des zones où la double hélice d'ADN se trouve entremêlée (Staczek et Higgins, 1998). La gyrase et la topoisomérase IV qui relaxent toutes deux les régions d'ADN entremêlées, permettent alors la diffusion du surenroulement non contraint et modulent donc la taille des domaines. Des mutations dans la gyrase et la topoisomérase IV ont donc pour effet d'augmenter la fréquence des barrières de diffusion (Staczek et Higgins, 1998, Stein *et al.*, 2005).

3.1.2 Les protéines bactériennes dont les fonctions sont similaires aux protéines histones chez les eucaryotes

Des protéines bactériennes similaires aux histones des eucaryotes sont capables de replier l'ADN ou de créer des ponts entre deux régions d'ADN éloignées. Lorsqu'elles sont en saturation, ces protéines se lient à l'ADN de façon non spécifique et peuvent, grâce à leur

habileté à condenser l'ADN, stimuler des mécanismes comme la transcription, la transposition et la recombinaison site-spécifique. Ces protéines contribuent en partie à l'organisation du chromosome (Dame 2005; Luijsterburg *et al.*, 2006).

HU (Histone like protein from *E.coli* strain U93) fut la première de ces protéines identifiées pour son rôle dans l'organisation de l'ADN. Cette protéine dimérique de 19 kDa (Rouviere-Yaniv et Gros, 1975) se retrouve entre 30000 à 60000 copies par cellule, et sa concentration varie en fonction de la phase de croissance (Azam *et al.*, 1999). HU lie l'ADN de façon non spécifique et forme un nucléofilament avec l'ADN lorsqu'elle est distribuée sur l'ensemble du chromosome (Azam *et al.*, 2000; Van Noort *et al.*, 2004; Sagi *et al.*, 2004). En enroulant l'ADN autour d'elle, HU a aussi la capacité de condenser et d'emprisonner le surenroulement négatif (Malik *et al.*, 1996; Bensaid *et al.*, 1996). En modulant le surenroulement de l'ADN, la protéine HU influence le processus de transcription et par conséquent l'expression génique (Kar *et al.*, 2005; Kar *et al.*, 2006). Le facteur IHF (Integration Host Factor) est une autre protéine de la famille des histones qui a des propriétés similaires à HU qui participe dans l'organisation du chromosome bactérien (Ali *et al.*, 2001).

H-NS (Heat-stable-Nucleotide-Structuring) est une autre protéine de la famille des histones. Au nombre de 20000 copies par cellules (Azam *et al.*, 1999), cette protéine introduit des courbures dans l'ADN (Rimsky, 2004). Active sous forme dimérique (Falconi *et al.*, 1988), sa taille de 15 kDa lui permet de créer un pont entre des fragments d'ADN adjacents (Dame, 2005; Dame *et al.*, 2000). *In vivo*, la surproduction de H-NS a pour conséquence un compactage très important de l'ADN (Tupper *et al.*, 1994; Spurio *et al.*, 1992).

Lrp (Leucine responsive protein) est une protéine qui répond aux changements de concentration de la leucine. C'est aussi une petite protéine de 15 kDa composée de quatre homo-dimers de Lrp qui forment une structure en disque possédant de multiples sites d'interaction avec l'ADN (Luijsterburg *et al.*, 2006). Lorsque Lrp adopte une telle structure, elle lie l'ADN au niveau de séquences consensus soit pour créer des ponts entre des duplexes d'ADN ou soit pour enrouler l'ADN et emprisonner le surenroulement (Beloin *et al.*, 2003; Jafri *et al.*, 1999). L'affinité de Lrp pour l'ADN s'accroît lorsque l'ADN adopte une forme de surenroulement plectonémique (Beloin *et al.*, 2003).

Fis (Factor for inversion stimulation) est une protéine homo-dimérique de 22 kDa qui induit un repliement de l'ADN de 50 à 90 degrés (Pan *et al.*, 1996). Fis est également un facteur d'initiation de la transcription de plusieurs gènes incluant *crp*, *topA* et les opérons ribosomiaux. La concentration de cette protéine varie en fonction du cycle cellulaire (Azam *et al.*, 1999). Son expression est en effet maximale en début de phase exponentielle, faible après l'entrée en phase exponentielle et absente lors de la phase stationnaire. FIS intervient indirectement dans le contrôle de la topologie de l'ADN quand elle régule l'expression des gènes de la gyrase et de la topoisomérase I (Schneider *et al.*, 1999). À haute concentration, elle enveloppe l'ADN et le condense soit en le repliant ou en formant des boucles stables (Skoko *et al.*, 2005).

La protéine de 19 kDa Dps (DNA protection during starvation) est considérée comme un membre de la superfamille des bactérioferritines. Surtout abondante lorsque la cellule entre en phase stationnaire, elle forme plusieurs oligomères capables de lier l'ADN et de le condenser (Luijsterburg *et al.*, 2006).

3.1.3 Les SMC

Les protéines SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) sont apparentées aux cohésines et aux condensines des eucaryotes. Ce sont des complexes homodimériques en forme de « V » (Losada and Hirano, 2005; Nasmyth and Haering, 2005) qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine qui fixe l'ATP (Hirano and Hirano, 2004). Grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, elles passent d'une forme en « V » ouverte à une forme en « V » fermée et condensent l'ADN en forme de rosettes (Case *et al.*, 2004). Cette structure en forme de rosette est stabilisée par la liaison des SMC avec leurs cofacteurs MukE et MukF pour MukB chez *E. coli*, ScpA et ScpB pour BsSMC chez *Bacillus subtilis*. Les SMC de *Bacillus subtilis* et d'*E. coli* sont distribués d'une manière uniforme sur le chromosome et contribuent directement à la condensation de l'ADN (Briton *et al.*, 1998). Les bactéries mutantes dans les gènes *muk* sont dépourvues de nucléoïde. Ce phénotype est corrigé par une inactivation de la topoisomérase I (Sawitzke et Austin, 2000). Il a donc été proposé que l'accumulation de surenroulement négatif en absence de topoisomérase I condense l'ADN et permet de compenser pour l'absence des protéines Muk.

L'autre protéine de la famille des SMC est FtsK. Cette protéine est une translocase qui se déplace de façon bidirectionnelle sur l'ADN en consommant de l'ATP (Pease *et al.*, 2005). En enroulant et en compactant l'ADN, elle facilite l'interaction des sites *dif* entre eux (Capiiaux *et al.*, 2002) et active alors la recombinaison site spécifique via XerCD (Massey *et al.*, 2004; Aussel *et al.*, 2002). Comme elle est liée à la membrane et localisée au niveau du septum, FtsK coordonne aussi la ségrégation des chromosomes avec la division cellulaire.

3.2 Autres protéines impliquées dans l'organisation de l'ADN

Dans le but d'identifier les barrières qui composent les domaines, deux gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur de *gyrA* ou de *gyrB*, sont insérés au hasard sur le chromosome (Hardy et Cozzarelli, 2005). Le promoteur de *gyrA* ou de *gyrB* est activé lorsque l'ADN se retrouve sous une forme relaxée. La relaxation de l'ADN suite à l'inactivation d'un gène susceptible de coder pour une protéine barrière, peut alors causer soit l'activation ou la répression des gènes rapporteurs placés au hasard sur le chromosome. Grâce à cette méthode, cinq gènes codants pour des protéines barrières ont pu être identifiés. Parmi ces cinq gènes, on distingue *fis*, *hns* et *dksA* qui sont connus pour leur rôle dans l'organisation du chromosome ainsi que deux autres gènes, *tktA* et *pgm*, impliqués dans le métabolisme des sucres. Le rôle de ces deux derniers gènes dans l'organisation de l'ADN est encore inconnu. *dksA* est un facteur essentiel pour l'effet *in vivo* du (p)ppGpp sur la transcription des ARN ribosomiaux et des gènes qui participent dans la synthèse des acides aminés. Il est donc très important dans la réponse stringente chez *E. coli* (Srivatsan et Wang, 2008).

3.3 Contribution des différentes protéines similaires aux histones dans l'organisation de l'ADN

Le degré de contribution des protéines similaires aux histones dans l'organisation de l'ADN reste encore indéterminé. *In vitro*, toutes ces protéines qui se lient à l'ADN ont clairement un effet sur son organisation, alors qu'*in vivo*, la contribution individuelle de chacune de ces protéines est difficile à vérifier. En effet, une mutation dans une des protéines de type histones est souvent compensée par la présence d'une autre mutation. Par exemple, une mutation dans HU ou IHF est viable, alors qu'une double mutation HU et IHF affecte la survie de la cellule (Kano et Imamoto, 1990). Les bactéries HU déficientes ont un nucléoïde décondensé et ce phénotype est encore plus marqué dans le double mutant HU et Fis (Paull et Johnson, 1995).

Un mutant MukB possède aussi un chromosome décondensé et le double mutant HU et MukB n'est pas viable (Graumann, 2001). L'abondance et la localisation cellulaire de ces protéines en fonction de la phase de croissance déterminent grandement leur contribution à l'organisation du chromosome. Par exemple, en début de phase exponentielle, Fis est abondante alors que HU est exprimée de façon maximale en phase exponentielle. En phase stationnaire, c'est plutôt IHF qui prend la relève sur HU, puis Dps qui remplace IHF en phase stationnaire tardive (Azam *et al.*, 2000; Azam *et al.*, 1999). FtsK est un exemple qui illustre bien le fait que la localisation cellulaire détermine le rôle de chaque protéine dans l'organisation de l'ADN. Étant localisée au niveau du septum, ceci limite son rôle dans la ségrégation des chromosomes (Aussel *et al.*, 2002).

3.4 Rôle de la réplication et de la transcription dans l'organisation de l'ADN chromosomique

Le déplacement des complexes enzymatiques de la réplication et de la transcription génère en amont du surenroulement positif et en aval du surenroulement négatif (Postow *et al.*, 1999; Liu et Wang, 1987). Le surenroulement positif est normalement relaxé par la gyrase, mais il arrive parfois que ces tensions positives s'accumulent lors de la réplication et diffusent vers l'arrière, formant alors des précaténanes entre les deux nouveaux brins d'ADN (Espeli et Mariani, 2004). Comme la réplication est semi-conservative, le surenroulement négatif créé en arrière du complexe de réplication est perdu par la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire. L'impact majeur de la réplication dans l'organisation de l'ADN est qu'elle défait les domaines en déplaçant les barrières de diffusion.

Lors de la transcription, des changements importants dans le surenroulement surviennent selon le modèle du « twin supercoiled domain » (Liu et Wang, 1987, figure 11). Ces changements transitoires sont régulés par la topoisomérase I et la gyrase, et sont localisés dans la région transcrite à cause de barrières de diffusion. À l'intérieur de chacun des domaines, des changements importants dans le surenroulement peuvent avoir lieu, dépendamment de la fréquence de transcription et de la longueur de l'ARN synthétisé (Wu *et al.*, 1988). Ceci est encore plus vrai si l'on considère que la taille d'un domaine peut être de 10 kb, car la tension accumulée devrait être très importante en regard de la petite taille du domaine. En plus d'induire des changements dans le surenroulement de l'ADN, le complexe de transcription en élongation constitue une barrière de diffusion du surenroulement, puisqu'il

est capable de bloquer la diffusion du surenroulement positif généré en avant de son déplacement (Scheirer et Higgins, 2001). L'attachement à la membrane de protéines liées directement ou indirectement à l'ADN peut aussi constituer des barrières de diffusion du surenroulement. En effet, lors la traduction couplée à la transcription de gènes qui codent pour des protéines transmembranaires, le complexe d'élongation ancre l'ADN à la membrane cellulaire. Un tel ancrage ajoute une barrière supplémentaire à celle de l'ARN polymérase pour la diffusion du surenroulement et favorise alors la formation des domaines (Lodge *et al.*, 1989; Woldringh, 2002). Un exemple bien connu est celui de la transcription du gène *tetA* qui code pour une pompe à efflux transmembranaire et qui induit des barrières de diffusion du surenroulement (Lynch et Wang, 1993; Albert *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 2004). La fréquence de transcription de l'ensemble des gènes chez *E. coli* est généralement faible, excepté pour celle des opérons ribosomiaux. À elle seule, la transcription des opérons ribosomiaux située dans une région bien précise du chromosome ne peut donc pas être suffisante pour la formation des quatre cents domaines existants chez *E. coli*. Le fait que les domaines varient en taille et sont distribués de façon stochastique serait peut-être une indication que la transcription a un rôle important à jouer dans leur formation. Les phénomènes de transcription ont lieu un peu partout sur l'ADN à des moments différents dépendant de leur induction. Dans ce cas, la transcription pourrait avoir un effet général sur le surenroulement de l'ADN (Krasilnikov *et al.*, 1999) et jouer un rôle dans la réorganisation des domaines après la réplication (Deng *et al.*, 2005).

4. Le surenroulement de l'ADN et la transcription

4.1 Le surenroulement de l'ADN et l'initiation de la transcription

Le surenroulement négatif permet l'ouverture des brins d'ADN et facilite l'initiation de la transcription (Saucier et Wang, 1972). Cependant, l'augmentation du surenroulement négatif au-delà d'un seuil physiologique peut diminuer l'initiation de la transcription et empêcher la transition vers la phase d'élongation (Lim *et al.*, 2003). Le repliement de l'ADN par des protéines ainsi que l'action à distance d'activateurs peuvent aussi favoriser l'initiation de la transcription. Un exemple bien connu est celui de l'initiation du gène *lacZ* qui dépend de l'effet synergique de son activateur CRP (Catabolic Repressor Factor) et du niveau de surenroulement négatif. Le surenroulement négatif facilite la liaison de l'ARN polymérase au

promoteur, alors que la liaison de CRP aux séquences activatrices sur l'ADN stabilise le complexe de transcription et favorise le passage d'un complexe fermé vers un complexe ouvert (Meiklejohn et Gralla, 1989; Straney *et al.*, 1989).

Si l'initiation de la transcription de nombreux gènes est favorisée par la présence de surenroulement négatif, les gènes qui codent pour la gyrase sont par contre favorisés par la relaxation du surenroulement négatif (Menzel et Gellert, 1987). Dans une étude utilisant des microarrays couvrant l'ensemble du génome d'*E. coli*, la réponse transcriptionnelle suite à une perte de surenroulement négatif montre que seulement 7 % des gènes (306 gènes) sont affectés (Peter *et al.*, 2004). Parmi ces 306 gènes, 106 augmentent leur expression et les 200 autres diminuent leur expression. Toujours dans cette étude, on constate que les gènes qui sont stimulés par la perte du surenroulement négatif possèdent des séquences promotrices AT riches, alors que ceux qui sont réprimés par cette perte du surenroulement négatif possèdent des séquences promotrices riches en GC (Peter *et al.*, 2004). La dépendance par rapport au surenroulement négatif pour l'initiation de la transcription des promoteurs GC riches est probablement causée par le fait que les liaisons GC sont plus stables que les séquences AT et donc plus difficilement séparables.

Si le surenroulement peut influencer l'initiation de la transcription, il pourrait aussi jouer un rôle de régulateur dans l'expression génique en agissant comme senseur et messenger des stimuli de l'environnement (Peter *et al.*, 2004). Une protéine de signalisation ou encore des facteurs physico-chimiques du milieu peuvent induire des changements dans le surenroulement, ce qui modulerait l'initiation de la transcription de certains gènes. Il a été démontré que des changements dans le nombre de Lk accompagnent la transition entre les différentes phases de croissance (Balke et Gralla, 1987) et que des changements dans le surenroulement de l'ADN sont impliqués dans l'expression des gènes de virulence de plusieurs bactéries pathogènes (Ye *et al.*, 2007). Le niveau surenroulement de l'ADN est aussi un bon moyen pour ajuster l'activité transcriptionnelle avec l'activité métabolique de la cellule. Il s'agit de contrôler la fréquence d'initiation de la transcription en modulant le niveau de surenroulement de l'ADN aux niveaux des promoteurs. L'activité de surenroulement positif ou négatif de la gyrase dépend du ratio ATP/ADP dans la cellule. Également, grâce à plusieurs petites molécules sensibles au niveau d'expression des ARN ribosomiaux, comme par exemple Fis et le ppGpp qui agirait par exemple via *dksA* (section 3.2), le niveau de

surenroulement pourrait être modulé (Muskhelishvili et Travers 2003, Travers et Muskhelishvili 2005).

La structure de l'ADN est également sensible à des changements physico-chimiques du milieu, comme par exemple le pH ou la température (Dorman, 1996; Karem et Foster, 1993). Des variations dans ces paramètres peuvent induire des changements de conformation dans l'ADN et favoriser l'initiation de la transcription de certains gènes (Higgins *et al.*, 1988). Ces types de changements de conformation sont transitoires car ils sont étroitement régulés par l'activité des topoisomérases (Ogata *et al.*, 1996; Tse-Dinh *et al.*, 1997). Par exemple, chez les bactéries hyperthermophiles, la concentration cellulaire de certaines topoisomérases et la régulation du surenroulement lors d'un stress de haute température induisent la thermotolérance (Lopez-Garcia et Forterre, 1999; Lopez-Garcia, 1999).

4.2 Le surenroulement et l'élongation de la transcription : le modèle du « twin supercoiled domain »

L'élongation de la transcription fait varier localement le surenroulement selon le modèle du « twin supercoiled domain » (Liu et Wang, 1987, figure 11). Comme le complexe de transcription ne peut tourner autour de l'ADN à cause sa taille importante, c'est plutôt l'ADN qui se déroule au fur et à mesure que le complexe de transcription se déplace. Ceci génère alors du surenroulement positif en avant et du surenroulement négatif en arrière du complexe de transcription (Liu et Wang, 1987). Ces changements dans le surenroulement de l'ADN sont régulés par la topoisomérase I, qui relaxe le surenroulement négatif, et par la gyrase qui relaxe le surenroulement positif. Après sa publication en 1987, de nombreuses études ont confirmé la validité du modèle du « twin supercoiled domain » (Rahmouni et Wells, 1992; Krasilnikov *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1988).

Lorsque les surenroulements positifs et négatifs générés par la transcription peuvent s'annuler, aucune variation topologique de l'ADN n'apparaît. Ceci est observé quand plusieurs ARN polymérases transcrivent de façon synchronisée. Lorsque les ARN

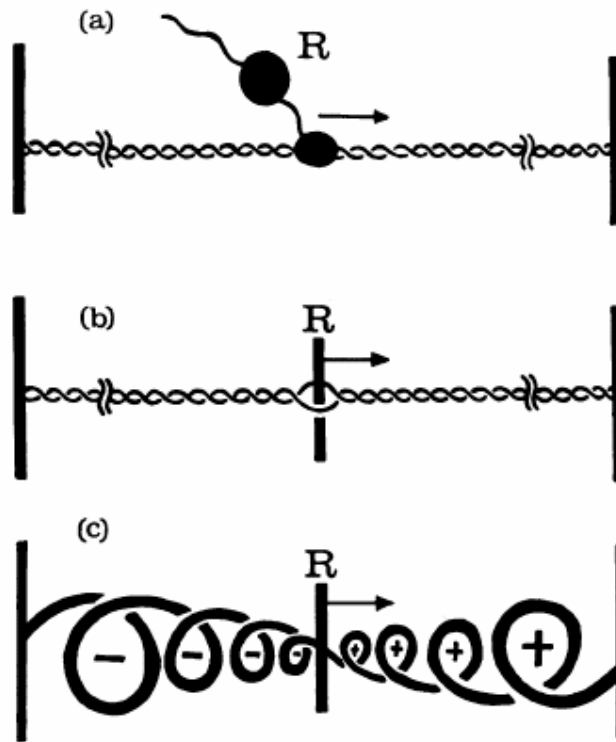


Figure 11 : Modèle du « twin supercoiled domain ». (a) Lors de la transcription, le déplacement de l'ARN polymérase engendre du surenroulement négatif en arrière et du surenroulement positif en avant du complexe de transcription (c). L'ARN polymérase (R) ne peut tourner autour de l'ADN, c'est plutôt l'ADN qui se déroule lors du déplacement de l'ARN polymérase (b). Les signes + et - indiquent le sens du surenroulement de l'ADN. Liu et Wang, 1987.

polymérase ne sont pas synchronisées, ou lorsque les gènes transcrits sont divergents, de fortes tensions positives s'accumulent en avant des ARN polymérase à cause des barrières de diffusion que représentent ces ARN polymérase (Drolet *et al.*, 1994b). Les variations du surenroulement générées par la transcription sont locales et transitoires, car elle sont induites par la transcription à l'intérieur d'un domaine, et parce qu'elles sont régulées par les topoisomérases (Abert *et al.*, 1996; Liu et Wang, 1987).

En absence de topoisomérase I, l'excès de surenroulement négatif produit par la transcription conduit à son accumulation. Ces variations du surenroulement peuvent atteindre des proportions importantes dépendant de la longueur de l'ARN synthétisé ou de l'ancrage à la membrane du complexe de transcription (Wu et al. 1988). En effet, le niveau de surenroulement négatif induit par la transcription est plus élevé lorsque la longueur de l'ARN transcrit augmente (Wu *et al.*, 1988).

L'ancrage à la membrane de l'ADN par le complexe de transcription lors du couplage transcription-traduction, empêche complètement la rotation de l'ADN (Pruss et Drlica, 1986). En absence de topoisomérase I, cet ancrage à la membrane de l'ADN conduit à la formation d'hypersurenroulement négatif (Lynch et Wang, 1993; Cook *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1994). Si l'ancrage à la membrane est éliminé par une mutation qui empêche la traduction de l'ARN messager (ARN_m), l'hypersurenroulement négatif qui se forme en absence de topoisomérase I devient alors directement lié à la formation d'hybride ARN/ADN ou R-loops (Drolet *et al.*, 1994; Massé et Drolet, 1999a et b).

5. Les R-loops

5.1 Définition

Les R-loops sont des hybrides ARN/ADN qui se forment pendant la transcription entre l'ARN naissant et son brin d'ADN complémentaire, laissant l'autre brin d'ADN non apparié (figure 12). Chez les procaryotes et les eucaryotes, plusieurs processus cellulaires requièrent la présence des R-loops. Par exemple, l'initiation de la réplication (Baker et Kornberg, 1988), la réplication de l'ADN mitochondrial (Okazaki *et al.*, 1970; Turchi *et al.*, 1994), la transcription inverse des ARN des rétrovirus (Varmus, 1988), la recombinaison lors du changement d'isotypes des immunoglobulines (Daniels et Lieber, 1995; Reaban et Griffin, 1990).

5.2 L'endoribonuclease HI: la RNase HI

Les R-loops sont sensibles aux RNases H, des ribonucléases qui dégradent uniquement l'ARN dans une telle structure. Les ribonucléases H sont retrouvées chez la plupart des organismes procaryotes et eucaryotes et sont classés en trois groupes par rapport à leur séquence en acides aminées (Ohtani et *al.*, 1999). Chez *E. coli*, il existe deux ribonucléases de type H, la RNase HI et la RNase HII, codées respectivement par les gènes *rnhA* et *rnhB* (Kanaya et *al.*, 1983; Itaya, 1990). Parmi ces deux ribonucléases, la RNase HI a été la plus étudiée. Cette enzyme est une endoribonuclease qui hydrolyse spécifiquement le lien phosphodiester de l'ARN d'un hybride ARN/ADN, produisant alors des ARN aux extrémités libres 3' OH et 5' monophosphates (Crouch et Dirksen, 1982). Des études ont montré que la RNase HI reconnaît spécifiquement la structure du duplexe ARN/ADN au niveau de son sillon mineur, parce que ce dernier adopte une structure de 8,5 Å (Angstrom). Cette structure est différente d'une forme de type A d'un hybride ARN/ARN qui est de 11 Å, et d'une forme de type B de l'ADN qui est de 7,5 Å (Nakamura et *al.*, 1991; Fedoroff et *al.*, 1993). Ceci est probablement la raison pour laquelle la RNase HI est capable de lier l'ADN double brin et les hybrides ARN/ARN sans pour autant pouvoir les éliminer (Lima et Crooke, 1997). Chez *E. coli*, les RNase H ne sont pas les seules enzymes capables d'éliminer des hybrides ARN/ADN (figure 13). Il existe en effet l'ADN polymérase I qui possède une activité exonucléase de 5' vers 3', l'exonucléase III qui est capable de dégrader aussi bien l'ADN que l'ARN dans un hybride ARN/ADN (Keller et Crouch, 1972), RecG et différentes protéines impliquées dans la recombinaison qui sont capables de déplacer un R-loop (section 7). Mentionnons également que la RNase HI participe avec l'ADN polymérase I dans l'élimination des fragments d'Okazaki (Ogawa et Okazaki, 1984).

5.3 La séquence nucléotidique et la formation des R-loops

La formation des R-loops dans les régions S des Immunoglobulines semble être dépendante de la richesse en bases C du brin matrice (Yu et *al.*, 2003). Lorsque la région S γ 3 est transcrite dans le sens non physiologique, c'est-à-dire à partir du brin riche en bases G, aucun R-loop n'est détecté. Lorsque cette région S est transcrite dans le sens physiologique, c'est-à-dire à partir de son brin C-riche, des R-loops aussi long que 1 Kb sont formés (Yu et *al.*, 2003). D'autre part, l'extension des R-loops au-delà de la région S γ 3, S γ 2b et S μ , corrèle parfaitement avec la richesse en bases C sur le brin matrice.

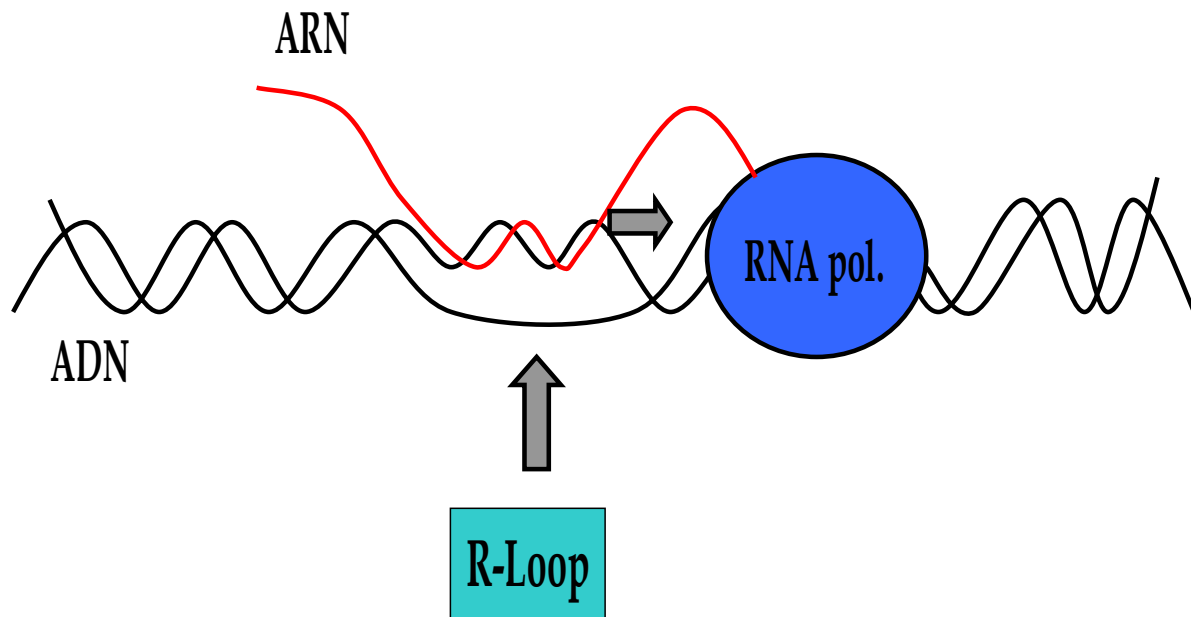


Figure 12 : Schéma d'un R-loop. À la sortie de l'ARN polymérase, l'ARN naissant s'hybride avec le brin d'ADN complémentaire laissant le brin d'ADN non complémentaire non apparié.

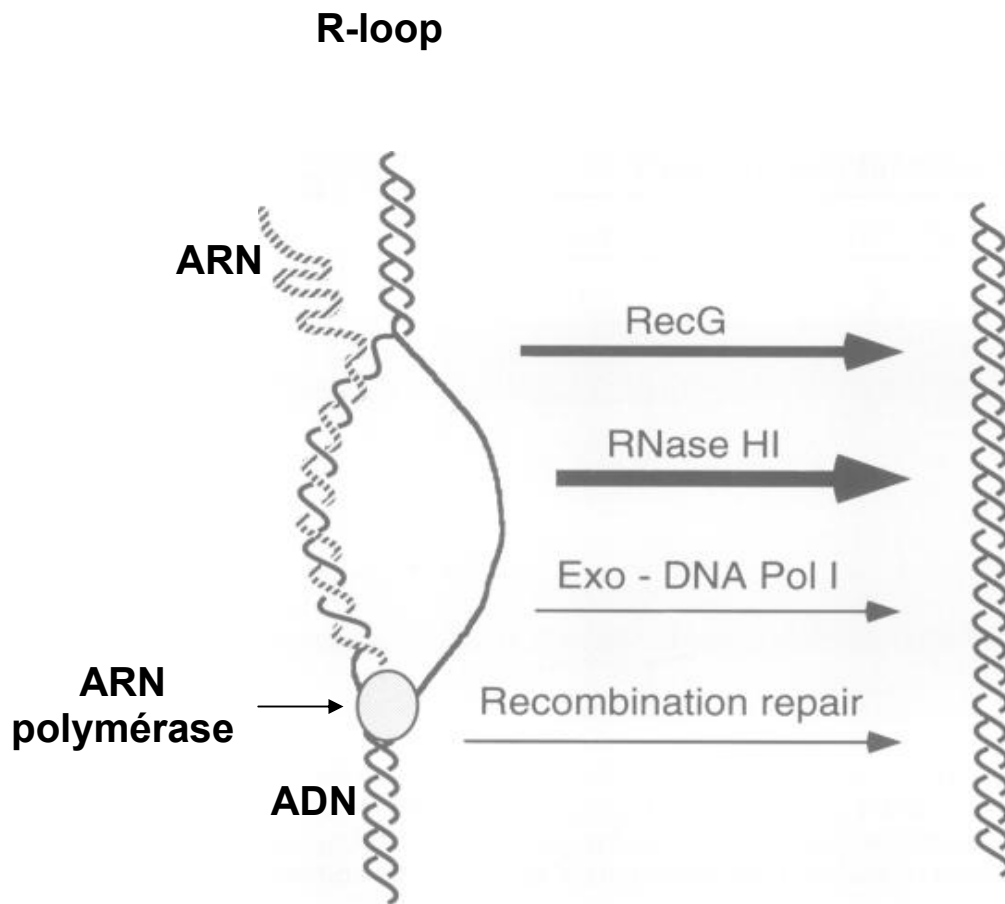


Figure 13 : Les différents facteurs et mécanismes impliqués dans l'élimination d'un R-loop. Hong et *al.*, 1995.

En effet, les séquences environnantes des régions S étant moins riches en bases C, la fréquence des R-loops dans ces régions est fortement diminuée (Huang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007).

La séquence conservée de CSBII de l'origine de réplication O_H de l'ADN mitochondriale (mtDNA) est également riche en bases G et C (Xu et Clayton, 1995). Ce sont les premières bases G incorporées dans l'ARN (rG) qui sont nécessaires et suffisantes pour déclencher la formation de R-loops stables et persistants dans la région CSBII (Xu et Clayton, 1995). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la transcription des séquences riches en bases G et C favorise également la formation des R-loops (Huertas et Aguilera, 2003). Le fait que la liaison entre ribonucléotides G et désoxyribonucléotides C (rG-dC) soit exceptionnellement stable, contribue grandement à la formation d'hybrides entre les ARN riches en G et leur ADN complémentaire riche en C (Sugimoto *et al.*, 1995).

5.4 Le surenroulement négatif et la formation des R-loops

Le surenroulement négatif généré par la transcription est également un facteur important dans la formation de R-loops (Massé et Drolet, 1999b; Drolet, 2006). Il permet l'ouverture des brins d'ADN qui favorisent l'hybridation de l'ARN naissant avec son ADN complémentaire. Les meilleures évidences du rôle du surenroulement négatif dans la formation des R-loops viennent des études de transcription *in vitro* à partir de plasmides surenroulés négativement. Lors de la transcription d'un plasmide pBR322 en présence de gyrase, il y a formation de R-loops, à moins que la topoisomérase I ne soit pas présente (Drolet *et al.*, 1994). La gyrase qui relaxe le surenroulement positif en avant du complexe de transcription augmente le surenroulement négatif et stimule l'élongation du R-loop, car elle facilite l'élongation de la transcription (Phoenix *et al.*, 1997). Dans des cellules déficientes en topoisomérase I, l'accumulation du surenroulement négatif lors de la transcription serait responsable de la formation de R-loops (Massé et Drolet, 1999a). L'ARN naissant sortant de l'ARN polymérase se réhybriderait avec son ADN complémentaire car cet ADN se trouverait sous forme simple brin suite à l'accumulation de surenroulement négatif (figure 12 et 15). La présence d'ADN simple brin durant la transcription serait donc favorable à la formation de R-loops. Ainsi, tout événement autre que le surenroulement négatif qui permettrait la séparation des brins d'ADN pourrait aussi déclencher la formation de R-loops. Chez la souris, la formation de quadruplex de guanine (G4) sur le brin non codant est accompagnée de la formation de longs hybrides

ARN/ADN stables lors de la transcription de la région *c-myc* des immunoglobulines (Duquette *et al.*, 2004). Un G4 est un carré plat de quatre guanines qui se forme par liaison Hoogsteen entre les résidus hydrogènes et oxygènes des guanines (Sen et Gilbert, 1988).

5.5 L'hypersurenroulement négatif et les R-loops

Plusieurs évidences montrent que la présence d'hypersurenroulement négatif est directement liée à la formation des R-loops. Lors de la transcription *in vitro* du plasmide pBR322, l'hypersurenroulement négatif formé en absence de topoisomérase I est sensible à la RNase HI (Drolet *et al.*, 1994; Massé et Drolet, 1999b). De même, la transcription *in vitro* dans le sens physiologique d'un fragment du gène *rrnB* des opérons ribosomaux, induit la formation d'hypersurenroulement négatif sensible à la RNase HI en présence d'un excès de gyrase par rapport à la topoisomérase I (Phoenix *et al.*, 1997).

Récemment publié, le modèle du « R-loop self promoting cycle » (auto-stimulation) tente d'expliquer plus en détail ce lien étroit entre la formation d'hypersurenroulement négatif et celle des R-loops (Drolet, 2006, figure 14). Dans ce modèle, la formation de R-loops favorisée par l'accumulation du surenroulement négatif en absence de topoisomérase I, emprisonne le surenroulement négatif. Le reste de l'ADN surenroulé positivement est alors relaxé par la gyrase qui introduit par conséquent plus de surenroulement négatif. Une fois que la RNase HI dans le milieu est venue à bout des R-loops formés, le surenroulement négatif qui était emprisonné peut alors diffuser et venir s'ajouter à celui introduit par la gyrase. Le résultat est la génération d'hypersurenroulement négatif et une plus grande proportion de brins d'ADN séparés. Dans cet état, l'ADN est favorable à la formation de nouveaux R-loops durant d'autres événements de transcription, ce qui amplifie alors le nombre de R-loops susceptibles d'être formés. Le cycle du « R-loop self-promoting » dépend en réalité de la compétition entre l'activité de la gyrase et celle de la RNase HI. Les essais *in vitro* montrent que lorsque la RNase HI est en faible concentration (concentration physiologique), l'action de la gyrase est plus rapide que celle de la RNase HI, ce qui conduit à l'accumulation de surenroulement négatif (Phoenix *et al.*, 1997). À faible concentration, l'inefficacité de la RNase HI à rivaliser avec la gyrase peut s'expliquer par son action distributive (Gaidamakov *et al.*, 2005). En effet, cette enzyme clive au hasard deux nucléotides d'un R-loop à la fois

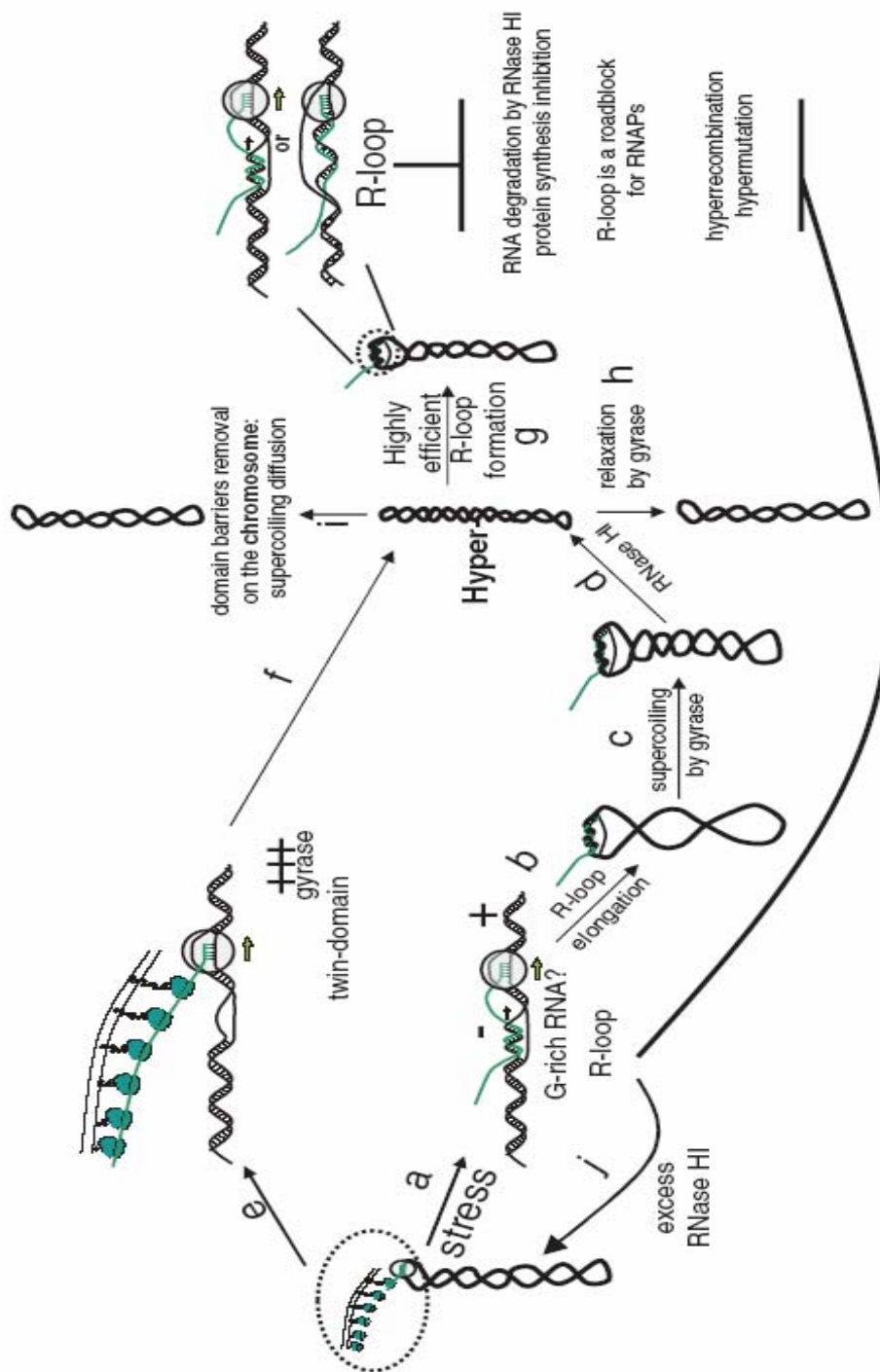


Figure 14 : Le modèle du « R-loop self promoting cycle ». Drolet 2006.

(Huang *et al.*, 1994), ce qui contribue grandement à la stabilité des R-loops. Par contre, lorsqu'elles sont surproduites, les molécules de RNase HI peuvent rapidement éliminer les R-loops formés et rivaliser avec la gyrase avant que cette dernière n'introduise beaucoup de surenroulement négatif.

5.6 Mécanismes de formation des R-loops

Deux mécanismes proposés par Drolet et ses collaborateurs peuvent expliquer la formation de R-loops (Drolet *et al.*, 2003) : (1) le prolongement de l'hybride ARN/ADN de 8 à 9 paires de bases présent dans la bulle de transcription et (2) le ré-appariement de l'ARN avec l'ADN à sa sortie de l'ARN polymérase. Dans le premier cas, la formation de R-loops serait directement liée aux propriétés de l'ARN polymérase et au processus de transcription. Dans le deuxième cas, la formation de R-loops serait plutôt dépendante de l'accumulation du surenroulement négatif à l'arrière de l'ARN polymérase et de la capacité de l'ARN à s'apparier avec l'ADN complémentaire.

Si les R-loops se formaient par le prolongement de l'hybride ARN/ADN à partir de la bulle de transcription, il y aurait donc une continuité entre l'hybride ARN/ADN de la bulle de transcription et celui en dehors de celle-ci. Par conséquent, le R-loop formé de cette manière serait résistant aux ribonucléases qui clivent l'ARN nu simple brin, comme la RNase A, T et E, et serait seulement sensible à la RNase HI. Des études de transcription avec l'ARN polymérase du phage T7 montrent que la formation de R-loops est très sensible à la RNase HI et très résistante aux RNase A et T (Massé et Drolet, 1999; Phoenix *et al.*, 1997). Ceci indique que l'ARN dans la bulle de transcription n'a jamais été déshybridé de l'ADN, et suggère que les R-loops se formeraient via le prolongement de l'hybride ARN/ADN à partir de la bulle de transcription. Ceci est quand même difficile à concevoir, puisque l'ARN synthétisé dans la bulle de transcription est déshybridé et déplacé vers un tunnel de sortie de l'ARN polymérase par une structure appelée gouvernail (Korzheva et Mustaev, 2001). La transcription sur un ADN surenroulé négativement avec l'ARN polymérase du phage T7, conduit à un état dans lequel l'ARN est séparé de l'ADN et interagit avec l'ARN polymérase, ainsi qu'à un autre état dans lequel l'hybride ARN/ADN est plus long et sensible à la RNase HI (Gopal *et al.*, 1999). La présence de l'un ou l'autre de ces états est fonction de l'énergie de réappariement des brins d'ADN, c'est-à-dire du niveau de surenroulement négatif. Il devient donc évident que plus le surenroulement négatif est élevé, plus le réappariement des brins d'ADN est

diminué, ce qui augmente la taille de la bulle de transcription et favorise l'allongement de l'hybride ARN/ADN (Gopal et *al.*, 1999).

Le second mécanisme de formation des R-loops consiste en la réhybridation de l'ARN avec son ADN complémentaire après sa sortie de l'ARN polymérase (figure 14). Deux conditions devraient être réunies pour que cela survienne. Premièrement, l'ARN à sa sortie de l'ARN polymérase devrait être nu, c'est-à-dire qu'il ne devrait pas être associé à des ribosomes (figure 14) et, deuxièmement, les deux brins d'ADN devraient être séparés pour permettre à l'ARN de s'hybrider avec son ADN complémentaire. La première condition serait fournie par un découplage entre la transcription et la traduction. Il a été démontré que la transcription de gènes non traduits conduit à la formation de nombreux R-loops en absence de topoisomérase I (Massé et Drolet, 1997; Massé et Drolet, 1999b). Le moment où l'ARN naissant se réhybride avec l'ADN à sa sortie de l'ARN polymérase est très important. En effet, si cet ARN se réhybride avec son ADN complémentaire tout juste après sa sortie de l'ARN polymérase, il y a donc peu de chances qu'un ribosome y fasse obstacle. Si par contre l'ARN s'hybride avec l'ADN à plusieurs nucléotides loin de sa sortie de l'ARN polymérase, il y aurait de fortes chances qu'un ribosome puisse inhiber la formation de R-loop. Un découplage entre la traduction et la transcription pourrait arriver suite à l'inactivation de ribosomes lors d'un stress. Les mutants *topA* sont effectivement sensibles aux stress oxydatifs et de hautes températures, à cause de la formation de R-loops qui inhibent l'expression des gènes de résistance à ces stress (Cheng et *al.*, 2003b, section 7.4).

La deuxième condition serait fournie par l'accumulation de surenroulement négatif à l'arrière de l'ARN polymérase. Nous avons déjà énuméré les évidences qui soutiennent le rôle majeur du surenroulement négatif dans la formation des R-loops (sections 5.4 et 5.5). De plus, même si l'accumulation du surenroulement négatif favorise l'allongement de la bulle de transcription, le mécanisme de formation des R-loops par le prolongement de l'hybride ARN/ADN dans la bulle de transcription est fortement limité par la présence du gouvernail. Ceci montre à quel point le mécanisme de formation de R-loops par réhybridation est plus probable que celui par le prolongement de l'hybride ARN/ADN déjà formé dans la bulle de transcription.

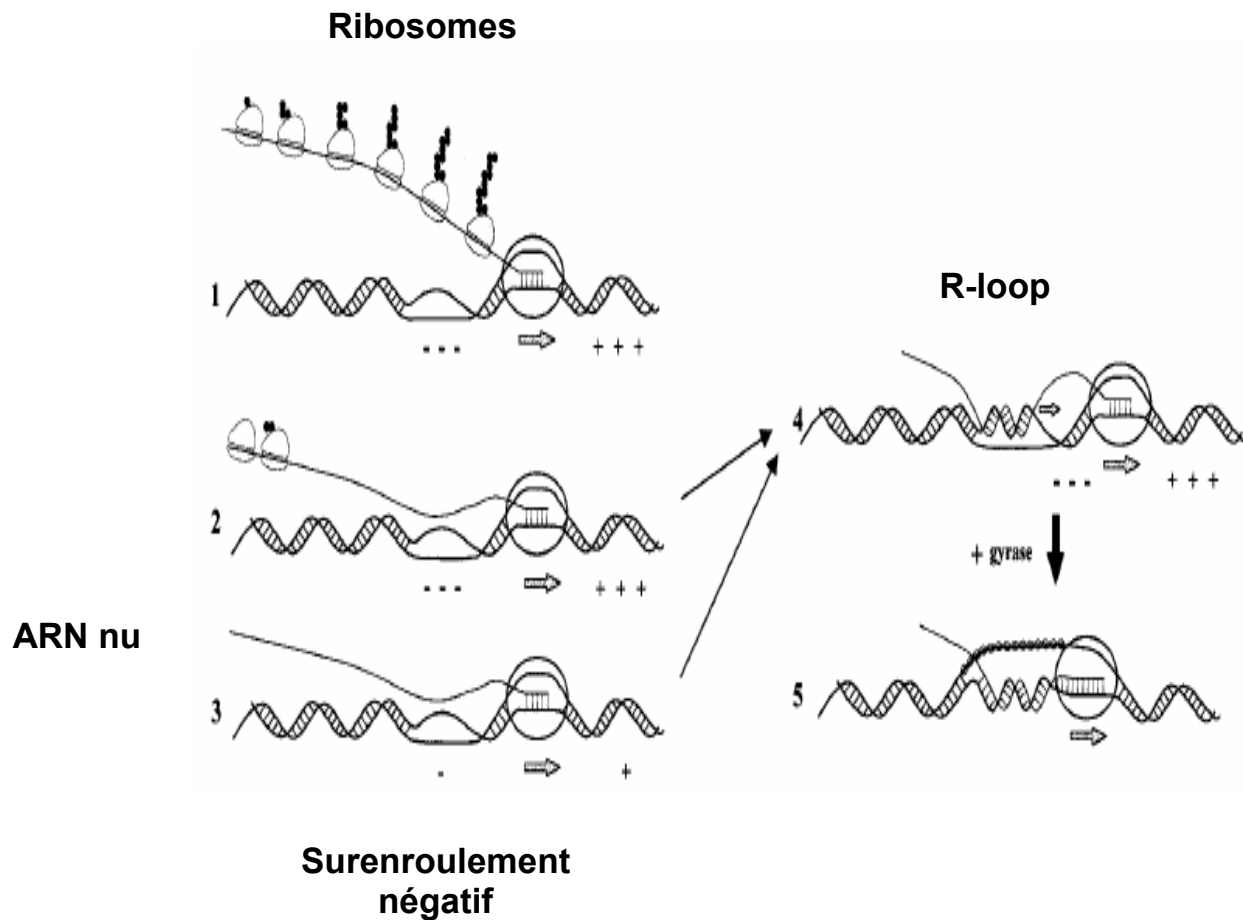


Figure 15 : Modèle de la formation d'un R-loop. L'accumulation de surenroulement négatif en arrière du complexe de transcription ainsi que l'absence de ribosomes sur l'ARNm favorisent l'hybridation de l'ARN naissant à sa sortie de l'ARN polymérase avec son ADN complémentaire. La gyrase qui élimine les tensions positives en avant de l'ARN polymérase, introduit du surenroulement négatif et facilite l'élongation du R-loop. - et + représentent les surenroulements positif et négatif générés pendant la transcription. Massé et Drolet, 1999c.

6. Les R-loops et les activités génomiques

6.1 Les R-loops dans la réplication des plasmides ColE1

Les premières évidences de la formation de R-loops nous viennent de l'étude de la réplication des plasmides ColE1. *In vitro*, la réplication de ces plasmides est initiée successivement par l'ARN polymérase, la RNase HI et l'ADN polymérase I (Itoh et Tomizawa, 1980). Un R-loop de 555 paires de bases est synthétisé par l'ARN polymérase en avant du site de réplication *Ori*, puis clivé par la RNase HI afin d'être utilisé comme amorce par l'ADN polymérase I. Des évidences génétiques montrent que la réplication *in vivo* de ce plasmide se déroule selon le même modèle qu'*in vitro*. En effet, la réplication de ColE1 dans une bactérie de type sauvage est sensible à la rifampicine, un antibiotique qui inhibe tout nouveau cycle de transcription (Clewell et Evenchick, 1973) et le plasmide ColE1 ne peut être maintenu dans une bactérie déficiente en ADN polymérase I (Kingsbury et Helinsky, 1970). Le rôle de la RNase HI dans la réplication *in vivo* de ColE1 est cependant moins évident (Naito *et al.*, 1984; Naito *et al.*, 1986). En absence de la RNase HI, la réplication à ColE1 peut quand même avoir lieu pour deux raisons : (1) la formation de l'hybride ARN/ADN par l'ARN polymérase au site d'initiation favorise la séparation des brins d'ADN et (2), l'hybride ARN/ADN qui se prolonge au-delà de site d'initiation peut servir d'amorce à l'ADN polymérase I (Inoue et Uchida, 1991; Masukata *et al.*, 1987; Dasgupta *et al.*, 1987). L'extrémité 3' OH de cette amorce est fournie suite à la terminaison prématurée de la transcription au-delà de site d'initiation.

6.2 Les R-loops dans la réplication de l'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondriale (mtDNA) est un ADN de forme circulaire qui se réplique de façon unidirectionnelle à partir de deux régions bien spécifiques situées sur les deux brins H et L de l'ADN (Kasamatsu et Vinograd, 1974). L'origine de réplication sur le brin d'ADN H (O_H) est située en amont du gène LSP, alors que l'origine de réplication du brin L (O_L) est située au 3/4 du génome par rapport à l'origine O_H . La réplication commence à partir du O_H et se poursuit jusqu'à ce que le brin H soit complètement répliqué (Shadel et Clayton, 1997). C'est uniquement lorsque la fourche de réplication rencontre la deuxième origine O_L , que commence la synthèse du brin L dans le sens opposé de celle du brin H (Clayton, 1991). La

transcription du gène LSP forme un R-loop stable dans la région O_H, ce qui permet la séparation des brins d'ADN et donne l'accès à l'ADN au complexe de réplication. Le R-loop formé à O_H sert aussi d'amorce pour la synthèse du brin H (Chang et Clayton, 1985, Chang et *al.*, 1985). Comme l'hybride ARN/ADN s'étend au-delà du site d'initiation O_H, l'endoribonucléase MRP (RNase MRP) chez la souris ou l'humain (Clayton, 1991) clive l'ARN pour servir d'amorce 3' OH (Lee et Clayton, 1997; Lee et Clayton, 1998). Cette endoribonucléase, présente chez de nombreux organismes (Bennett et *al.*, 1992; Dairaghi et Clayton, 1993; Paluh et Clayton, 1995; Schmitt et Clayton, 1992), reconnaît spécifiquement les régions ARN/ADN et ADN simple brin formées par un R-loop (Lee et Clayton, 1997). Le clivage de l'ARN s'effectue au niveau de 3 régions conservées situées en aval du site O_H : CSBI, CSBII et CSBIII (Walberg et Clayton, 1981). La RNase MRP, présente aussi bien dans les mitochondries que dans le noyau des cellules Eucaryotes (Li et *al.*, 1994), joue également un rôle direct dans le clivage du précurseur 5,8S de l'ARN ribosomal (ARNr) (Schmitt et Clayton, 1993; Chu et *al.*, 1994; Lygerou et *al.*, 1996).

6.3 Les R-loops et les gènes qui codent pour les Immunoglobulines

Les lymphocytes de type B non stimulés expriment généralement des Immunoglobulines d'isotype M ((Ig)M). Lorsqu'ils sont stimulés par un antigène et un lymphocyte de type T, ils prolifèrent et se différencient en cellules exprimant des immunoglobulines avec de nouveaux isotypes D, G, E ou A. Le changement d'isotypes consiste à remplacer l'isotype existant par un nouveau grâce à un mécanisme de recombinaison appelé « Class Switch Recombination » (CSR). Le CSR se déroule dans la région où se trouvent les différents gènes qui codent pour les isotypes (Stavnezer, 1996). La région en question est composée des différents gènes C_μ, C_δ, C_{γ3}, C_{γ1}, C_{γ2b}, C_{γ2a}, C_ε, et C_α qui codent respectivement pour les isotypes, IgM, IgD, IgG3, IgG1, IgG2b, IgG2a, IgE, et IgA, chacun étant précédé par une séquence non codante S qui porte le même nom (Dunnick et *al.*, 1993, Kinoshita et Honjo, 2000). Les régions S peuvent s'étendre de 1 à 10 kb et sont composées de séquences riches en base G répétées en tandem. Par exemple, la région S_μ contient une séquence de 20 paires de bases (GAGCT)₃(GGGGT) répétées au moins 150 fois sur une longueur de 3 kb. La transcription *in vitro* et *in vivo* de chacune des régions S qui ont été étudiées, produit un ARN non traduit susceptible de former un R-loop (Reaban et *al.*, 1994, Daniels et Lieber, 1995, Yu et *al.*, 2003). Le déclenchement du CSR est dépendant du processus de transcription (Chaudhuri et

al., 2007) et est beaucoup plus efficace lorsque les séquences S sont présentes. Une délétion de la région *S_γ* diminue de trois fois le CSR chez la souris (Luby *et al.*, 2001).

6.4 Les R-loops et le cSDR

6.4.1 Le cSDR

La réplication du chromosome bactérien débute habituellement à un site unique appelé origine de réplication ou *OriC*. *OriC* est composée de 4 séquences identiques de 9 paires de bases appelées boîtes DnaA, et de séquences répétées de 13 paires de bases riches en A et en T. Une protéine appelée DnaA se lie spécifiquement aux séquences répétées de la région *OriC*, permettant l'ouverture des brins d'ADN. L'action de DnaA facilite donc l'accès à l'ADN au complexe d'initiation de la réplication, le primosome. Pour former le primosome, DnaA recrute DnaC, DnaC recrute l'hélicase DnaB puis la primase DnaG (Snyder et Champness, 1997). L'ouverture des brins d'ADN est donc l'événement primordial pour initier la réplication. L'ajout de chloramphénicol (inhibiteur de la synthèse protéique) dans une culture cellulaire en phase exponentielle inhibe la synthèse de nouvelles protéines DnaA (synthèse *de novo*) et donc tout nouveau cycle de réplication. Dans certaines conditions, la réplication peut quand même avoir lieu malgré l'inhibition de la synthèse *de novo* et l'absence de DnaA. Chez *E. coli*, la séparation des brins d'ADN peut être induite soit par la réponse SOS dont les intermédiaires de recombinaison forment des D-loops, ou soit par la formation de R-loops pendant la transcription. Un D-loop est une structure formée de trois brins ADN dont deux sont hybridés entre eux et l'autre est simple brin. Cette réplication indépendante de DnaA est appelée « stable DNA replication » (SDR). Normalement réprimé, le SDR peut être induit ou être constitutif. Le SDR induit est appelé iSDR (inducible Stable DNA Replication) et le SDR constitutif est appelé cSDR (constitutive Stable DNA Replication) (Kogoma, 1997).

Dans des mutants *rnhA* (RNase HI inactivée), la réplication n'est plus spécifique à l'origine *OriC* mais a également lieu à différentes origines appelées *OriK* (von Meyenburg *et al.*, 1987, Ogawa *et al.*, 1984). Si le cSDR dans un mutant *rnhA* ne nécessite pas la synthèse de nouvelles protéines, il est par contre dépendant de la transcription car l'ajout de rifampicine abolit le cSDR (Kogoma *et al.*, 1985). C'est la formation de R-loops aux sites *OriK* qui semble déclencher le cSDR. La RNase HI a donc pour effet d'éliminer les R-loops formés sur

le chromosome aux sites *OriK* et de conférer la spécificité d'initiation de la réplication à *OriC* (Ogawa *et al.*, 1984). La recherche des sites d'initiation *OriK* a permis d'identifier 5 régions sur le chromosome, dont deux d'entre elles sont situées dans les régions *terC* (de Massy *et al.*, 1984). Pendant le cSDR, la réplication est semi-conservative et tout le chromosome est dupliqué (Kogoma, 1978; Kogoma, 1997). Cependant, l'initiation aux sites *OriK* est aléatoire et la fréquence d'initiation est réduite de 3 à 4 fois par rapport à celle d'*OriC* (von Meyenburg *et al.*, 1987). Ceci expliquerait pourquoi on observe une diminution de 40 % de la croissance dans le double mutant *rnhA* et *OriC* (von Meyenburg *et al.*, 1987), et pourquoi la présence d'*OriC* est absolument requise pour maintenir la viabilité dans un milieu riche (Kogoma *et al.*, 1985). Il est aussi intéressant de mentionner que puisque le cSDR est aléatoire, la réplication du chromosome n'est plus coordonnée avec le cycle cellulaire, ce qui donne des cellules dont l'aspect et la teneur en ADN sont très hétérogènes (von Meyenburg *et al.*, 1987).

6.4.2 Les facteurs impliqués dans le cSDR

Le cSDR est indépendant de DnaA mais requiert absolument la protéine RecA pour initier la réplication (Kogoma *et al.*, 1985). Principalement impliquée dans la recombinaison associée à la réparation de l'ADN, RecA est une protéine de la famille des recombinases qui possède une activité de recombinaison ainsi qu'une activité co-protéase. Cette protéine a trois rôles bien identifiés (Cox, 2007). Premièrement, elle joue un rôle central dans la recombinaison : elle lie l'ADN simple brin sur lequel elle polymérise pour former un nucléofilament, puis permet l'alignement des brins d'ADN et l'invasion du brin homologue. Deuxièmement, elle a un rôle de régulateur dans la réponse SOS : l'activité co-protéase de RecA facilite l'autoclivage du répresseur LexA (Little, 1993; Little, 1991) qui contrôle l'expression de nombreux gènes de la réponse SOS (Brent et Ptashne, 1981; Little *et al.*, 1981; section 6.6). RecA permet l'autoclivage de UmuD qui active UmuD', une composante de la polymérase V (Pham *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 1999). L'autoclivage de LexA et UmuD est facilité par RecA uniquement lorsque cette dernière se retrouve associée à l'ADN (Suton *et al.*, 2000, Murli *et al.*, 2000). Son dernier rôle consiste à aider l'ADN polymérase V à répliquer l'ADN à travers des lésions (Cox, 2007). Dans le cSDR, c'est l'activité de recombinaison de RecA et non celle de la co-protéase qui est requise pour initier la réplication (Kogoma *et al.*, 1994; Torrey et Kogoma, 1982). Le mécanisme exact par lequel RecA initie le cSDR n'a pas encore été élucidé. Il semble que la formation de R-loops aidée par la protéine RecA serait le mécanisme déclencheur du cSDR. En se basant sur une étude *in vitro*, Kogoma proposa un modèle dans

lequel le nucléofilament formé par RecA favoriserait la formation de R-loops (Kogoma, 1987, Kasahara et *al.*, 2000). Le nucléofilament RecA fournirait un substrat d'ADN simple brin et stabiliserait les R-loops formés en empêchant le réappariement des deux brins d'ADN entre eux. Il a été montré que la formation d'un nucléofilament par RecA peut permettre l'échange de brins entre un ARN simple brin et un ADN (Zaitsev et Kowalczykowski, 2000). L'importance de RecA dans le cSDR ne fait aucun doute (Kogoma, 1997), pourtant il existe plusieurs possibilités qui permettent de contourner cette nécessité (Kogoma, 1997). Des mutations qui inactivent le gène *lexA* restaurent le cSDR dans un double mutant *rnhA recA* (Torrey et Kogoma, 1982; Torrey et Kogoma, 1987), et l'activité exonucléase 5' vers 3' de l'ADN polymérase I ainsi que son activité d'élongation, peuvent aussi se substituer à RecA dans le cSDR pour le mutant *rnhA recA* (Cao et Kogoma, 1993). Une fois que RecA a initié le cSDR, d'autres protéines sont alors requises pour démarrer la réplication. Ces protéines sont DnaB, G et C du primosome, la polymérase III (Kogoma, 1997), PriA (Masai et *al.*, 1994) ainsi que l'ADN polymérase I (Kogoma et Maldonado, 1997; Kogoma, 1997). L'activité exonucléase 5' vers 3' ainsi que l'activité de polymérisation de l'ADN polymérase I sont toutes deux requises pour initier la réplication via le cSDR (Kogoma et Maldonado, 1997). La polymérase III est surtout importante lors de l'étape de l'élongation de la réplication. Codée par le gène *priA*, PriA est une ATPase ADN hélicase (Shlomain et Kornberg, 1980a; Wickner et Hurwitz, 1975; Lee et Mariani, 1987; Lasken et Kornberg, 1988) qui à l'origine fut isolée comme protéine essentielle pour la réplication du phage ϕ X174 (Shlomain et Kornberg, 1980b). Cette protéine permet d'assembler dans l'ordre les différentes protéines PriB, DnaT, PriC, DnaC, DnaB et DnaG qui constituent un réplisome (Baker et Wickner, 1992; Mariani, 1992). Ce réplisome permet la synthèse d'une amorce ARN et recrute l'ADN polymérase III pour répliquer l'ADN.

Les éléments majeurs qui appuient le rôle des R-loops dans le déclenchement du cSDR sont : (1) le fait que le cSDR est observé dans des cellules déficientes en RNase HI et (2) l'implication de RecA dans la formation des R-loops. De plus, la découverte que RecG est impliquée dans la formation des R-loops et le cSDR vient aussi appuyer ce rôle que jouent les R-loops dans le cSDR. RecG est une hélicase qui fait la migration des jonctions « Holliday » dans le sens 3' vers 5' lors de la recombinaison (LLoyd et Sharples, 1993; Whitby et *al.*, 1994). Capable de déplacer *in vitro* l'ARN d'un R-loop (Vincent et *al.*, 1996), elle diminue fortement le nombre de copies des plasmides ColE1 lorsqu'elle est surexprimée *in vivo* (Vincent et *al.*, 1996). RecG est ainsi capable d'éliminer les R-loops formés à ColE1 (Fukuoh

et *al.*, 1997). De même, elle serait capable d'éliminer les R-loops formés à l'origine de réplication du mtDNA (Ohsato et *al.*, 1999). Dans les cellules déficientes en RecG, on note aussi que le cSDR est exprimé quoique plus faiblement que dans un mutant *rnhA* (Hong et *al.*, 1995).

6.5 Les R-loops et l'instabilité génomique

Une autre conséquence de la formation de R-loops est l'induction de phénomènes d'hyper-recombinaison et d'instabilité génomique. Ces phénomènes ont surtout été observés chez les eucaryotes au cours de l'étude des facteurs impliqués dans le métabolisme de l'ARN ainsi que dans le CSR (Class Switch Recombination).

Chez les eucaryotes, le complexe THO/THREX participe dans le processus d'élongation de la transcription. Chez la levure, THO est un complexe de 4 protéines, Tho, Hpr1, Mft1 et Thp2 (Chavez et *al.*, 2000) qui se retrouve dans un plus large complexe appelé THREX. THREX est formé de l'association de THO avec les protéines Sub2 et Yra1, impliquées dans le transport de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme (Strasser et *al.*, 2002). Des mutations dans l'une des unités du complexe THO ou THREX provoquent l'induction de phénomènes d'hyper-recombinaison (Chavez et Aguillera, 1997; Piruat et Aguillera, 1998, Prado et *al.*, 1997; Jimeno et *al.*, 2002; Fan et *al.*, 2001). Des expériences de transcription *in vitro* réalisées à partir d'extraits cellulaires de cellules mutantes pour *hpr1*, *tho2* ou *mft1*, ont montré que l'élongation de la transcription était significativement inhibée (Rondon et *al.*, 2003). Dans les mutants THO/THREX, le lien direct entre l'inhibition de la transcription et l'hyper-recombinaison est la formation d'hybrides ARN/ADN ou R-loops (Huertas et Aguillera, 2003). Dans leur étude, Huertas et Aguillera détectent en effet la présence de R-loops dans un mutant *hpr1* et montrent que l'hyper-recombinaison est corrigée par la surproduction de la RNase HI humaine, ou par le clivage de l'ARN naissant par un ribozyme (Huertas et Aguillera, 2003).

Les protéines ASF/SF2 chez les eucaryotes font partie de la famille SR de protéines impliquées dans la maturation des introns du pre-ARNm (Sanford et *al.*, 2003). Une délétion de ASF/SF2 a pour conséquences l'apparition de cassures d'ADN double brin, l'induction de la recombinaison, des réarrangements géniques et la perte de matériel génétique (Li et *al.*,

2005, figure 15). La formation de R-loops est responsable de ce phénomène d'instabilité génomique. La présence de R-loops a été détectée dans les régions où ont lieu les cassures dans l'ADN, et la surproduction de la RNase HI dans les cellules mutantes pour *ASF/SF2* corrige le phénotype d'instabilité génomique. Dans des expériences de transcription *in vitro* à partir d'une séquence d'ADN riche en GC, la formation de R-loops a aussi été constatée lorsque les facteurs ASF/SF2 sont omis dans la réaction (Li et *al.*, 2005). Pour expliquer le rôle d'ASF/SF2 dans l'instabilité génomique, Li et Manley proposent un modèle dans lequel le recrutement de ASF/SF2 par l'ARN polymérase permet la maturation de l'ARNm naissant et prévient donc la formation de R-loops. Le clivage des introns durant le processus de maturation du pre-ARNm changerait l'ordre de la séquence nucléotidique sur l'ARNm ce qui empêcherait alors cet ARNm de s'hybrider avec l'ADN codant (Niu, 2007). Chez les eucaryotes, l'association des facteurs du métabolisme de l'ARN à l'ARN polymérase et à l'ARNm serait donc un processus équivalent au couplage entre la traduction et la transcription chez les procaryotes. L'existence de ce processus serait nécessaire pour prévenir la formation de R-loops et les dommages que ces R-loops engendreraient pour les cellules (Li et *al.*, 2005; Aguilera, 2005; Drolet, 2006).

Dans les cellules mammifères, de longs R-loops stables dans les régions S des immunoglobulines déclenchent le CSR. Le mécanisme exact du CSR n'est pas encore connu, mais on sait qu'il est dépendant de la transcription et de l'activité d'une cytidine désaminase, l'AID (Manis et *al.*, 2002; Honjo et *al.*, 2002; Muramatsu et *al.*, 2000). Le rôle de la transcription dans le CSR est directement lié à la formation de R-loops au niveau des régions S (section 5.3 et 6.3). La protéine AID spécifiquement exprimée dans les lymphocytes de type B (Okazaki et *al.*, 2002), est capable d'enlever un résidu amine sur les cytosines lorsque l'ADN est simple brin (Chaudhuri et *al.*, 2003). L'AID est spécifique à certaines séquences motifs sur l'ADN appelées WRC (W pour les pyrimidines A et T, et R pour les purines G et C) (Beale et *al.*, 2004; Pham et *al.*, 2003), mais cette spécificité peut être largement compensée par la présence d'un ADN simple brin. L'accumulation de surenroulement négatif dans les régions d'ADN non transcrites favorise en effet l'action de l'AID (Shen et *al.*, 2004). Ceci suggère que c'est la présence d'ADN simple brin qui est suffisante pour l'activité de cette enzyme (Zarrin et *al.*, 2004). La présence de motifs WRC, combinée à la présence d'un ADN simple brin lors de la transcription, serait donc suffisante pour déclencher le CSR via l'activité de l'AID (Ramiro et *al.*, 2003). Ceci supporte bien l'idée qu'un R-loop dans la région S induirait le CSR en ciblant l'activité de l'AID (Yu et *al.*, 2005, Yu et *al.*, 2003). Un modèle

présenté à la figure 18 explique comment la formation de R-loops cible l'activité de l'AID dans les régions S des immunoglobulines et conduit au CSR (Fugmann et Schatz, 2003).

6.6 Les R-loops et la réponse SOS

La réponse SOS est induite grâce à un signal intracellulaire déclenché lorsque l'ADN est endommagé. Son but est de réparer l'ADN à tout prix pour permettre la survie de la cellule. Le signal qui déclenche la réponse SOS est l'association de RecA à l'ADN simple brin (nucléofilament) lorsque la cellule tente de répliquer son ADN endommagé. L'interaction du répresseur LexA avec le nucléofilament de RecA favorise son auto-digestion et déclenche alors l'expression d'un grand nombre de gènes. Parmi ces nombreux gènes on distingue : *umuDC* qui code pour l'ADN polymérase V capable de répliquer l'ADN à travers des lésions, *ruvAB* qui code pour les protéines du même nom et qui permet la migration des brins d'ADN dans la jonction Holliday, *sulA* qui est un inhibiteur de la division cellulaire. Ces nombreux gènes sont impliqués dans la recombinaison, la répllication de l'ADN, la réparation de l'ADN et la division cellulaire (Walker et al., 2006). Dans des mutants *rnhA* et *recG* chez *E. coli*, la réponse SOS est fortement induite et est constitutive (Kogoma et al., 1993; Kogoma, 1997, Llyod et Buckman, 1991). Dans une population de cellules mutantes pour *recG* ou *rnhA*, la réponse SOS est limitée car elle est présente chez un nombre restreint de cellules, en plus d'être moins bien exprimée que dans un mutant *lexA* (McCool et al., 2004). La réponse SOS est pourtant présente dans un mutant *rnhA*. Elle est plus fortement induite lorsque les protéines RecB et RecD de la recombinaison homologue sont absentes. RecB et RecD font partie du complexe RecBCD. Ce complexe est une hélicase et exonucléase (RecD) qui se déplace sur l'ADN à partir de son bout 3' tout en le dégradant, jusqu'à ce qu'elle rencontre une séquence appelée « Chi ». L'activité de RecBCD permet en réalité de fournir un ADN simple brin pour RecA. En absence de l'activité exonucléase RecD, la survie du mutant *rnhA* devient dépendante de la recombinaison homologue par la voie alternative RecF (Kogoma et al., 1993). La survie d'un mutant *rnhA* est donc dépendante de la recombinaison homologue RecBCD et RecFOR (Kogoma et al., 1993). L'induction par les R-loops du processus de recombinaison nous suggère que la recombinaison homologue serait un moyen pour éliminer les R-loops, avant qu'ils ne causent des dommages aux cellules et n'induisent la réponse SOS. Comme la RNase HI est impliquée dans le clivage des fragments d'Okazaki (Murante et al., 1998; Ogawa et Okazaki, 1984), il se pourrait fort bien que dans un mutant *rnhA*, ces fragments soient responsables de cassures doubles brins ou simples brins et qu'ils induisent la

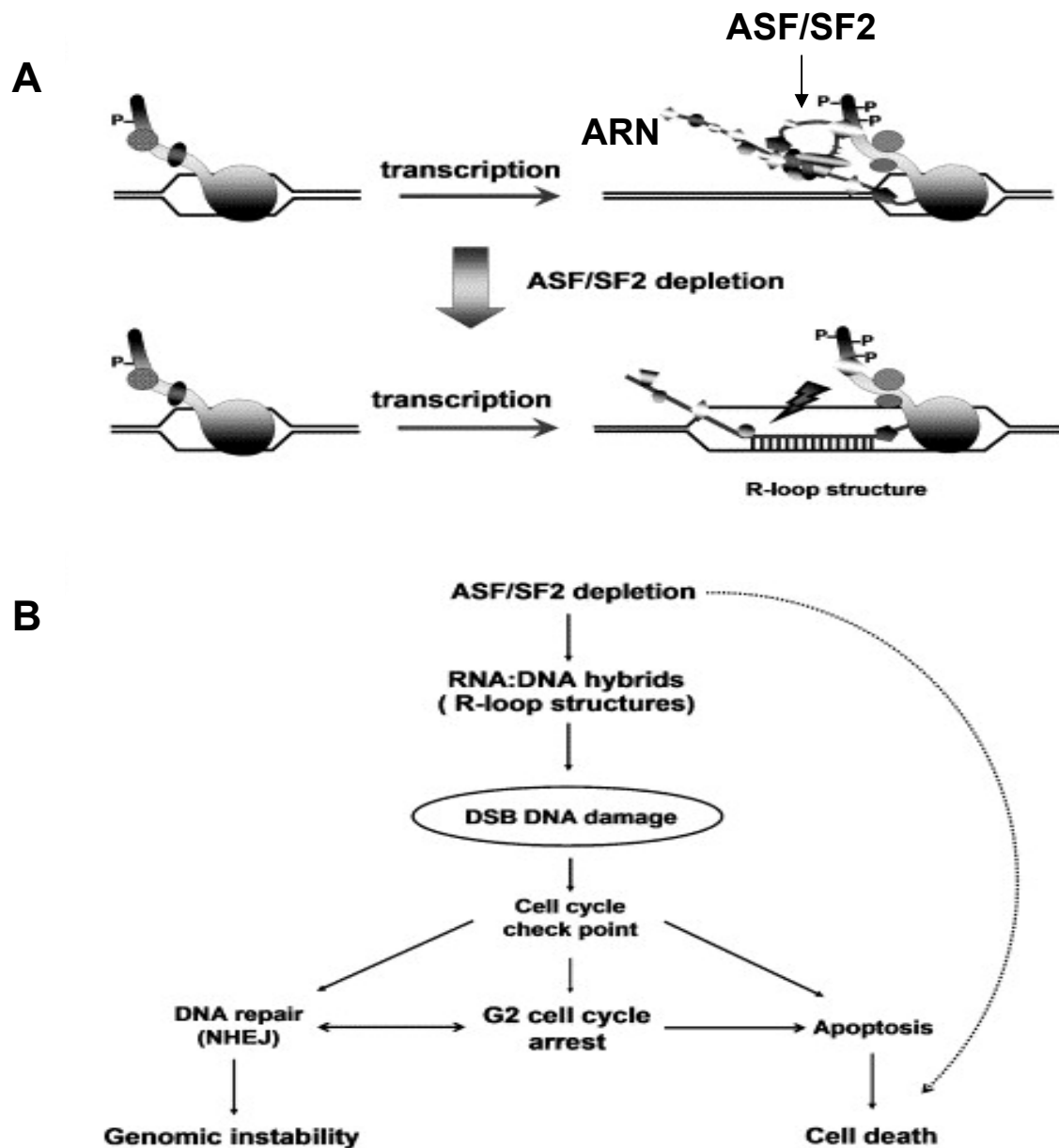


Figure 16 : Rôle des protéines SR ASF/SF2 dans la stabilité génomique chez la levure. (A) La transcription en absence d'ASF/SF2 conduit à la formation de R-loops. (B) Conséquences de la formation de R-loops en l'absence d'ASF/SF2. Li et *al.*, 2005.

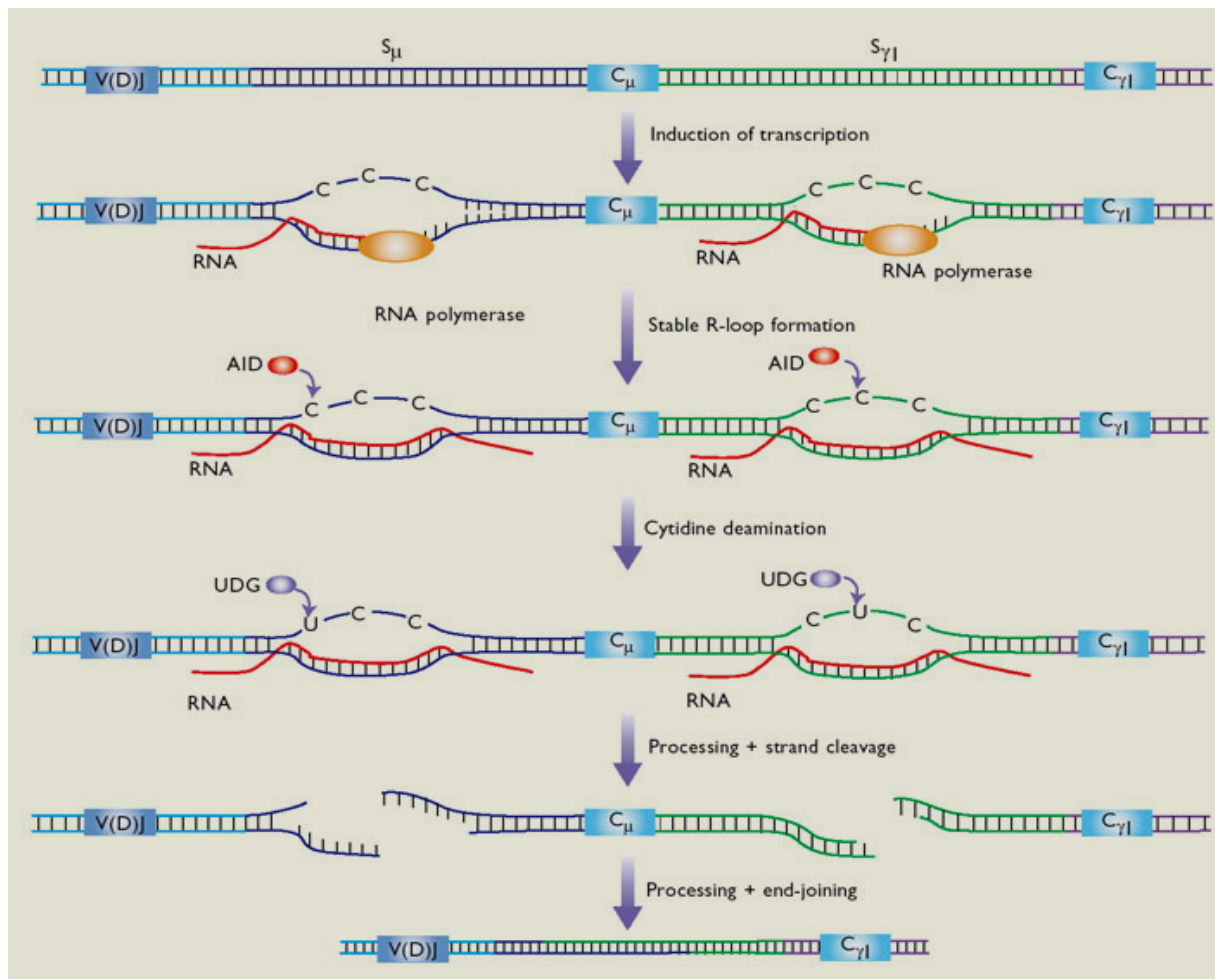


Figure 17 : Mécanisme du CSR déclenché par la formation des R-loops et par l'action de l'AID. La formation de R-loop dans les régions S des immunoglobulines fournit un ADN simple brin pour l'AID. L'AID enlève un groupement amine sur les cytosines qui deviennent alors des uraciles. L'UDG (Uracile Desoxyglycosylase) élimine les uraciles créant ainsi des trous dans l'ADN. Il s'en suit un clivage du R-loop et une cassure double brin qui mènent à une perte de matériel génétique et à un réarrangement génique. Fugmann et Schatz, 2003.

la réponse SOS. Des blocages de fourches de réplication ou des collisions entre ADN polymérase causées par la présence de R-loops ou des fragments d'Okazaki stables, pourraient être responsables des cassures dans l'ADN et de la perte de matériel génétique (Olavarieta *et al.*, 2002; Camps et Loeb, 2005). En effet, la réponse SOS dans un mutant *rnhA* est plus fortement induite au sein d'un milieu riche car les fourches de réplication sont supposées être plus nombreuses (Kogoma *et al.*, 1993). La progression des fourches de réplication est inhibée par la transcription chez les levures déficientes en THO (Wellinger *et al.*, 2006), suggérant aussi que la formation de R-loops serait capable de causer des arrêts de la fourche de réplication.

Dans un mutant *rnhA* et *recG*, le système de « Restriction-Modification » (R-M) est fortement inhibé. Ceci pour empêcher la mort cellulaire suite au clivage d'ADN non méthylé (Blakely et Murray, 2006). Pendant la réplication, le nouveau brin d'ADN synthétisé est temporairement non méthylé, ce qui le distingue du brin original et permet au système « Methyl-Directed Mismatch repair » de reconnaître des erreurs d'incorporation de nucléotides et de les réparer de façon fidèle au brin original. Le R-M est composé d'enzymes possédant deux activités : l'une étant une activité de transfert de groupement méthyle sur des séquences d'ADN non modifiées, l'autre étant le clivage des séquences d'ADN non modifiées (Roberts *et al.*, 2003). Ce système protège la cellule de l'intrusion d'ADN étranger comme par exemple celui des phages. Lorsque un ADN est fraîchement synthétisé, comme par exemple pendant la réplication ou lorsque l'induction de la réponse SOS permet de repartir la réplication, le R-M est immédiatement inhibé suite à la dégradation de l'enzyme de restriction par la protéase ClpXP (Thoms et Wackernagel, 1984; Makovets *et al.*, 1999; Blakely et Murray, 2006). Dans des mutants *rnhA* et *recG*, le R-M est inhibé indiquant que des R-loops seraient à l'origine de dommages causés à l'ADN qui induisent l'apparition de nouveaux brins d'ADN, grâce à des mécanismes de recombinaison associés à la réplication (Blakely et Murray, 2006).

6.7 Les R-loops et leurs effets sur l'expression génique

La plupart des bactéries qui vivent dans l'environnement sont constamment soumises à des stress, comme par exemple le manque de nourriture disponible ou des conditions physiques et chimiques extrêmes. Les stress peuvent être classés par rapport à leur degré de sévérité. Dans un stress mineur, la croissance est affectée mais continue à un rythme identique une fois que les cellules se sont adaptées. Dans un stress sévère, les cellules peuvent toujours s'adapter

mais la croissance cellulaire est fortement diminuée. Dans un stress extrême, la croissance cellulaire cesse et les cellules sont en mode de survie. Dans un stress létal, la mort de nombreux individus est constatée. L'adaptation des bactéries aux stress passe par une réponse physiologique hautement régulée et spécifique à chaque stress. La survie des bactéries aux stress dépend de l'état dans lequel se trouve les cellules avant qu'elles soient soumises aux stress. Lors de l'adaptation aux stress, la réponse physiologique inclut l'expression de nombreux gènes par l'intermédiaire d'une régulation au niveau transcriptionnelle et traductionnelle. Des cellules déficientes en topoisomérase I ont un taux de survie fortement diminué lorsqu'elles sont soumises à un stress létal de type oxydatif ou de très haute température (51°C) (Tse Dinh, 2000; Qi et *al.*, 1999). Lors d'un stress sévère à 42 °C, la production de protéines de stress DnaK et GroEL est diminuée en absence de topoisomérase I (Qi et *al.*, 1996). Lorsque ces mutants sont préalablement incubés à 42 °C avant le stress de 51 °C, ils survivent aussi bien que des cellules de type sauvage (Qi et *al.*, 1999). Ces cellules topoisomérase I déficientes ne sont donc pas capables de s'adapter rapidement à un stress de haute température à 51 °C. Par contre, en les laissant un certain temps à une température non létale de 42°C, une préadaptation est possible. La formation de R-loops en absence de topoisomérase I semble être responsable de l'inhibition de l'expression de protéines de stress car la surproduction de la RNase HI corrige le problème de synthèse de ces protéines de stress et améliore grandement la survie de ces cellules à 42 °C, 52 °C et lors d'un stress oxydatif (Cheng et *al.*, 2003b).

Un défaut de croissance lié à la formation de R-loops a également été observé dans ces cellules déficientes en topoisomérase I (Drolet et *al.*, 1995). Le degré de correction du défaut de croissance du mutant *topA* est proportionnel à la concentration cellulaire de RNase HI. Plus la concentration de RNase HI augmente, plus la croissance est améliorée (Drolet et *al.*, 1995). De plus, l'accumulation d'hypersurenroulement négatif à cause des R-loops corrèle avec l'inhibition de la croissance à basse température (Massé et Drolet, 1999c). Ces défauts de croissance liés à la formation de R-loops ne sont pas causés par le cSDR, ni dus à l'induction de la réponse SOS ou d'autres formes de recombinaison associées à la réplication. En effet, dans un mutant *topA* aucun de ces phénomènes n'a été détecté (Drolet et *al.*, 2003). Les défauts de croissance liés à la formation de R-loops semblent plutôt être causés par un défaut de l'expression génique. L'inhibition de l'expression génique dans un mutant *topA* se reflète par l'accumulation d'ARNm et d'ARN ribosomaux (ARNr) incomplets, en proportion plus importante que celle d'ARNm et d'ARNr de pleine longueur (Baaklini et *al.*, 2004;

Hraiky et *al.*, 2000). La surproduction de la RNase HI qui rétablit la croissance, élimine aussi l'accumulation d'ARNm et d'ARNr incomplets tout en favorisant la production d'ARN de pleine longueur (Baaklini et *al.*, 2004). La difficulté à produire des ARNm de pleine longueur et l'apparition d'ARN incomplets corrèle parfaitement avec l'inhibition de la croissance. En effet, la surproduction de la RNase HI qui favorise la production d'ARNm de pleine longueur au détriment d'ARNm incomplets, rétablit aussi la croissance. Aussi, les ARNm incomplets sont présents seulement lorsque la croissance est inhibée. Lorsque la croissance qui était arrêtée reprend, les ARNm incomplets disparaissent alors au profit de la réapparition d'ARNm de pleine longueur (Baaklini et *al.*, 2004).

7. Projet de recherche

Le but de ma thèse est d'élucider le ou les mécanismes par lesquels la formation de R-loops pourrait inhiber l'expression génique et la croissance bactérienne. Au cours de notre étude, nous avons utilisé deux types de souches bactériennes qui ont la particularité de former des R-loops. Une des souches est déficiente en topoisomérase I (*topA*) et possède une mutation compensatoire et thermosensible dans le gène *gyrB* (*gyrB*(Ts)) (Drolet et *al.*, 1995), alors que l'autre souche est déficiente en RNase HI (*rnhA*) (Ogawa et *al.*, 1984).

Pour la souche *topA gyrB*(Ts) qui pousse à 37 °C (température permissive pour la croissance), la croissance est possible grâce à l'expression de la mutation *gyrB*(Ts) qui rend moins efficace l'activité d'introduction de surenroulement négatif de la gyrase. À cette température, le niveau de surenroulement négatif de l'ADN est tolérable en absence de topoisomérase I car il est inférieur à celui d'une cellule de type sauvage (Drolet et *al.*, 1995). À 28 °C (température non permissive pour la croissance), la mutation *gyrB*(Ts) ne s'exprime plus et la gyrase redevient pleinement active (Steck et Drlica, 1984), favorisant alors l'augmentation du surenroulement négatif de l'ADN. À 28 °C, le mutant se comporte alors comme un simple mutant *topA*, c'est-à-dire qu'il accumule du surenroulement négatif et forme des R-loops (Drolet et *al.*, 1995). La croissance du double mutant *topA gyrB*(Ts) peut donc se dérouler à une température permissive de 37 °C, avant qu'il ne soit transféré à une température non permissive de 28 °C pour étudier les effets de la formation de R-loops sur la croissance (Drolet et *al.*, 1995). Pour démontrer que les effets observés en absence de topoisomérase I sont causés par la formation de R-loops, on surproduit en *trans* la RNase HI et on s'attend à la disparition de ces effets.

En utilisant ce modèle expérimental, Hraiky et ces collègues ont démontré que des R-loops formés dans le mutant *topA gyrB*(Ts) inhibaient la synthèse des ARN ribosomiaux (ARNr) durant l'étape d'élongation de la transcription (Hraiky et al., 2000). Cette inhibition de la synthèse des ARN ribosomiaux pourrait expliquer en partie l'inhibition de la croissance car elle serait susceptible d'engendrer des problèmes de synthèse protéique. Les ARNr incomplets produits étant assez stables (détectés 30 minutes après l'ajout de rifampicine), il a été proposé que des blocages de la transcription causés par la formation de R-loops seraient à l'origine de la production d'ARNr incomplets. Le modèle suggéré suppose qu'un R-loop serait capable de bloquer la progression des ARN polymérases au début de l'opéron *rrnB*, au niveau de la séquence « leader » riche en GC dont on sait qu'elle est sujette à la formation de R-loops (Massé et Drolet, 1997). Un blocage de la transcription peut se définir comme un ralentissement ou un arrêt de la progression de l'ARN polymérase, lorsque cette dernière rencontre un obstacle sur l'ADN. En 2004, nous avons également démontré que la croissance du double mutant *topA gyrB*(Ts) qui est normale à 37 °C, cesse immédiatement après le transfert à 28 °C (Baaklini et al., 2004). Cet arrêt de la croissance n'est pas permanent car celle-ci reprend après un certain temps à un taux cependant plus faible qu'une souche isogénique *gyrB*(Ts). Lors de l'arrêt de la croissance à 28 °C, nous avons constaté une inhibition de la synthèse protéique de *novo* associée à un défaut dans la synthèse des ARNm. Les défauts de synthèse constatés pour plusieurs ARNm (*lacZ*, *yhdG-fis*, *crp*) sont similaires à ceux observés pour les ARNr. En effet, des ARNm incomplets en proportion plus importante que celle des ARNm de pleine longueur ont tendance à s'accumuler. Pour démontrer que le manque d'ARNm de pleine longueur n'était pas dû à une baisse de l'initiation de la transcription, des expériences d'extension d'amorces ont alors été réalisées. L'inhibition de la transcription des ARNm dans le double mutant *topA gyrB*(Ts) avait donc eu lieu durant l'étape de l'élongation de la transcription. Ces résultats nous ont donc suggéré que l'arrêt de la croissance a été causé par une inhibition de la synthèse protéique, elle-même engendrée par un défaut dans la production d'ARNm et d'ARNr de pleine longueur. Ceci fut confirmé par : (1) l'incapacité du mutant à induire la réponse ppGpp RelA-dépendante à 28 °C, laquelle est induite lorsque le site de l'ARN de transfert sur le ribosome est non chargé soit à cause d'une pénurie d'ARNt ou d'ARNm, et (2), par la présence d'ARNm incomplets seulement lorsque la croissance est inhibée. La formation de R-loops est bien responsable de ces effets, car la surproduction de la RNase HI corrige très bien tous ces phénotypes. Elle favorise en effet la production d'ARNm de pleine longueur, elle rétablit la synthèse protéique et permet la croissance. L'effet majeur de la surproduction de la RNase HI dans le mutant *topA gyrB*(Ts)

semble être directement lié à la production d'ARNm de pleine longueur. Même lorsque toute synthèse protéique *de novo* est inhibée par l'ajout d'un antibiotique telle que la spectinomycine, la surproduction de la RNase HI favorise toujours la synthèse d'ARNm de pleine longueur. Les R-loops formés en absence de topoisomérase I devraient donc être responsables de la production d'ARNm incomplets en défaveur de celle d'ARNm de pleine longueur. Ceci aurait pour conséquence d'inhiber l'expression génique et donc la croissance.

En parallèle avec ces travaux publiés en 2004, nous avons aussi démontré pour la première fois que dans le mutant dépourvu de RNase HI (mutant *rnhA*), les R-loops peuvent aussi causer une inhibition de l'expression génique. Dans ces mutants, il est surtout connu que les R-loops sont à l'origine du cSDR et de la réponse SOS. Pour expliquer cette inhibition de l'expression génique on pourrait penser à plusieurs possibilités. Les phénomènes de recombinaison associés à la réplication déclenchés par les R-loops dans le mutant *rnhA* pourraient induire une inhibition de l'expression génique, soit en constituant un obstacle au processus de transcription ou en modifiant le surenroulement de l'ADN (Camps et Loeb, 2005). Il se pourrait aussi que des R-loops du mutant *rnhA* conduisent à la production d'ARNm et d'ARNr incomplets au détriment d'ARN pleine longueur de façon similaire qu'en absence de topoisomérase I. Dans ce cas, la croissance du mutant *rnhA* serait altérée, de même que sa résistance aux stress de hautes températures et oxydatifs pourrait être diminuée.

Malgré l'avancée majeure dans la compréhension des effets des R-loops sur la croissance du mutant *topA*, plusieurs questions sont restées sans réponses. Premièrement, on ne sait toujours pas de quelle façon les R-loops génèrent des produits d'ARNr et d'ARNm incomplets. Ceci pourrait être le résultat de blocages transcriptionnels comme le suggère l'étude sur les ARNr (Hraiky et al., 2000). Deuxièmement, on ne sait non plus de quelle façon la formation de R-loops conduit à l'inhibition de la synthèse protéique *de novo*. Est-ce la conséquence de la production de ribosomes défectueux causée par les défauts de synthèse dans l'ARNr, combinée à la difficulté à produire des ARNm de pleines longueurs ? Troisièmement, s'il semble évident que l'effet majeur de la surproduction de la RNase HI est de permettre la production d'ARN de pleine longueur, comment cela est-il possible, puisque cette enzyme possède une activité de dégradation de l'ARN ? Finalement, nous avons constaté que la croissance du mutant *topA gyrB(Ts)* s'arrêtait immédiatement après le transfert de 37 °C à 28 °C puis reprenait après un certain temps à un taux très faible. Si la réactivation de la gyrase à 28 °C est responsable de l'accumulation de surenroulement négatif qui déclenche la formation

de R-loops, pourquoi alors la croissance est-elle capable de reprendre à 28 °C malgré le fait qu'à cette température, la gyrase devrait rester pleinement active ? Il serait donc important de chercher à comprendre ce qui permet la reprise de la croissance car cela nous renseignerait sur la nature du stress subi par les cellules, et sur les moyens dont la cellule disposerait pour contrer la formation des R-loops. Ceci nous permettrait également de mieux comprendre comment les R-loops pourraient se former.

Par l'entremise de mon projet de doctorat, j'ai tenté de répondre à ces nombreuses questions. Afin d'avoir une meilleure idée générale sur l'effet des R-loops sur l'expression génique et, pour mieux supporter l'ensemble de nos résultats, nous avons étudié ce phénomène dans deux différentes souches mutantes qui forment des R-loops, la souche *rnhA* et la souche *topA*.

II. ARTICLE 1

Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation.

Imad Baaklini¹, Valentine Usongo¹, Flora Nolent¹, Patrick Sanscartier¹, Chadi Hraiky¹, Karl Drlica² and Marc Drolet^{1,3}

¹ Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, P. Québec, Canada, H3C 3J7

²Public Health Research Institute, Newark, NJ

³Corresponding author

Phone : 514-343-5796

FAX: 514-343-5701

Electronic mail address: marc.drolet@umontreal.ca

Running title: Supercoiling and growth inhibition.

Key words: supercoiling, *topA*, topoisomerase I, gyrase, RNase HI.

CONTRIBUTIONS

Dans cet article, j'ai effectué l'ensemble des travaux sur les ribosomes et sur les ARN messagers (ARNm) associés aux ribosomes. Il s'agit des expériences de fonctionnalité des ribosomes, des profils de ribosomes et de l'extraction des ARNm associés aux différentes fractions de ribosomes. La méthode utilisée pour extraire les ARNm des fractions de ribosomes est une technique originale que j'ai développée. J'ai également effectué l'expérience de cinétique de synthèse protéique ainsi que le Northern blot de *fis* montrant la stabilité de cet ARNm. De nombreux autres résultats non montrés furent également obtenus pour appuyer les résultats présentés dans cet article. Il s'agit de Northern blots de *crp* et d'autres ARNm, d'immunoprécipitation de CRP, de l'étude du tmRNA dans la production d'ARN incomplets et dans l'inhibition de la synthèse protéique et de l'étude du facteur de terminaison Rho dans la production d'ARNm incomplets.

1. RÉSUMÉ

Chez *E.coli*, l'hypersurenroulement négatif induit par la transcription est particulièrement présent dans des cellules déficientes en topoisomérase I (*topA*). L'impact que peut avoir la présence d'hypersurenroulement négatif sur la physiologie cellulaire demeure encore obscur. Lors d'une chute de température, un arrêt de la croissance et à une accumulation d'hypersurenroulement négatif sont observés dans le mutant *topA*. Ces deux événements sont encore plus prononcés lorsque la température est plus basse. La surproduction de la RNase HI, une enzyme qui élimine les R-loops, corrige ces deux phénotypes. Alors que l'activité des extraits de ribosomes est normale quand la croissance est arrêtée, les ARNm de *fis* sont en nombre très réduit et ceux de *crp* sont courts, les polysomes sont relativement moins nombreux que les monosomes, et la synthèse protéique diminue considérablement comme le montre le ratio de protéine de haut poids moléculaire sur celles de faible poids moléculaire. Nous observons également que le processus de maturation et de dégradation sont les deux altérés pour les ARNm de *fis* et de *lacA*. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les ARN sont dégradés lors de l'inhibition de la croissance. Les effets observés ne sont pas atténués par une mutation de la RNase E, ce qui signifie que cette endoribonucléase n'est pas impliquée dans le défaut de maturation de l'ARN. L'ajout de spectinomycine, un inhibiteur de la synthèse protéique, ne change pas non plus ces effets, ce qui appuie l'idée qu'ils ne sont pas causés par l'activité de ribonucléases. Nous montrons aussi que des R-loops se forment en très grand nombre lors de la transcription *in vitro* d'un plasmide hypersurenroulé négativement. Pour la première fois, nos résultats nous permettent de proposer un modèle qui expliquerait comment l'hypersurenroulement négatif peut inhiber la croissance. Dans ce modèle, la gyrase favorise l'accumulation d'hypersurenroulement négatif qui conduit alors à la dégradation de l'ARN, et la surproduction de la RNase HI limite l'accumulation d'hypersurenroulement négatif prévenant ainsi la dégradation de l'ARN.

2. SUMMARY

Transcription-induced hypernegative supercoiling is a hallmark of *E. coli* topoisomerase I (*topA*) mutants. However, its physiological significance has remained unclear. Temperature downshift of mutant gave transient growth arrest and a parallel increase in hypernegative supercoiling that was more severe with lower temperature. Both properties were alleviated by overexpression of RNase HI. While ribosomes in extracts showed normal activity when obtained during growth arrest, mRNA on ribosomes was reduced for *fis* and shorter for *crp*, polysomes were much less abundant relative to monosomes, and protein synthesis rate dropped, as did the ratio of large to small proteins. Altered processing and degradation of *lacA* and *fis* mRNA was also observed. These data are consistent with truncation of mRNA during growth arrest. These effects were unaffected by a mutation in the gene encoding RNase E, indicating that this endonuclease is not involved in the abnormal mRNA processing. They were also unaffected by spectinomycin, an inhibitor of protein synthesis, which argued against induction of ribonuclease activity. *In vitro* transcription revealed that R-loop formation is more extensive on hypernegatively supercoiled templates. These results allow us, for the first time, to present a model by which hypernegative supercoiling inhibits growth. In this model, the introduction of hypernegative supercoiling by gyrase facilitates degradation of nascent RNA; overproduction of RNase HI limits the accumulation of hypernegative supercoiling, thereby preventing extensive RNA degradation.

3. INTRODUCTION

DNA supercoiling is tightly regulated by opposing enzymatic activities in bacterial cells. DNA gyrase, encoded by *gyrA* and *gyrB*, introduces (12, 13) and maintains (8) negative supercoiling, while topoisomerase I (*topA*) and topoisomerase IV (*parC* and *parE*) remove excess negative supercoiling (37, 41, 49). Too much negative supercoiling can be detrimental to cell growth, as initially revealed by genetic studies in which *topA* null mutants of *Escherichia coli* were found to carry compensatory *gyrA* or *gyrB* mutations that reduced chromosomal supercoiling (7, 37). Plasmid DNA extracted from these *topA* null mutants had very high levels of negative supercoiling (35). pBR322 topoisomers that could not be resolved by conventional agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine, a DNA-intercalating dye, were described by the term “hypernegative supercoiling” (35). Such topoisomers had a superhelical density that was more than twice the average seen with wild-type cells (35).

Hypernegative supercoiling was attributed to transcription of the *tetA* gene on pBR322 (36) and was explained by the twin-domain model in which a moving transcription complex generates negative supercoiling behind the complex and positive supercoiling in front of the complex (22). By removing the positive supercoils in the absence of topoisomerase I, DNA gyrase generates hypernegatively supercoiled DNA. Hypernegative supercoiling is particularly evident in plasmids carrying genes encoding membrane-bound proteins such as TetA (23, 25), presumably because coupled transcription-translation and membrane anchorage of nascent protein restrict DNA rotation. A requirement for membrane anchorage is bypassed if coupled transcription-translation originates from very strong promoters, such as the hybrid Tac promoter (40) or, as shown more recently, from a promoter recognized by T7 RNA polymerase (38). In each of these cases, the physiological significance of hypernegative supercoiling is unclear, as no phenotype is attributed to it. More importantly, hypernegative supercoiling is observed under conditions permissive for the growth of *topA* null mutants.

In contrast, when cells are downshifted from 37 to 28 °C and below, hypernegative supercoiling in *topA* null mutants correlates with growth inhibition (28, 30). This is most evident when *topA* null cells also carry a *gyrB*(Ts) allele that allows gyrase re-activation after temperature downshift (28, 30). In this situation, hypernegative supercoiling depends on transcription, but not translation. Moreover, it is not restricted to genes expressed from very strong promoters. Instead, downshift-based hypernegative supercoiling is related to R-loop formation coupled to gyrase activity (10, 29, 33). Overproduction of RNase HI, an enzyme that degrades the RNA of R-loops,

compensates for the growth defects of *topA* null mutants and reduces hypernegative supercoiling associated with temperature downshifts (11).

We recently used *topA* null *gyrB*(Ts) strains to study the physiological consequences of temperature downshifts in the absence of topoisomerase I (2). Transient growth inhibition correlated with both a reduction in rate of protein synthesis and with accumulation of truncated RNAs at the expense of normal full-length RNAs, phenotypes that were corrected by RNase HI overproduction (2). Since supercoiling measurements were not included in this work, whether and how these phenotypes are related to hypernegative supercoiling is unknown. The effect of RNase HI overproduction was explained in the context of local transcription-induced negative supercoiling without considering the global supercoiling level during the temperature downshift. We proposed that transcription-induced negative supercoiling promoted R-loop formation. The R-loops, when not removed rapidly by RNase HI, might act as roadblocks for subsequent transcribing RNA polymerases, thereby leading to accumulation of shorter than full-length RNAs (2). According to this model, RNase HI overproduction, by continuously removing R-loops, would lead to substantial RNA degradation, which was not the case (2). Moreover, R-loops might turn over too rapidly to act as roadblocks for the majority of genes, since most *E. coli* genes are transcribed at low rates (45). Thus an alternate explanation is required.

The present study showed that RNA degradation associated with hypernegative supercoiling was probably responsible for the growth inhibition of *topA* null mutants. By limiting the accumulation of hypernegative supercoiling, RNase HI overproduction prevented RNA degradation. When the level of RNase HI was low, as in wild-type cells, hypernegative supercoiling accumulated, which led to extensive R-loop formation and RNA degradation. Thus, cells unable to keep supercoiling from reaching unacceptably high levels are compromised in the ability to grow due to extensive RNA degradation.

4. MATERIALS AND METHODS

***E. coli* strains and plasmids.** *Escherichia coli* strains used in this work are described in Table 1. The *rneA14* derivatives of RFM445 and RFM475 were constructed by transduction with P1vir phage (32) grown on AC28 (MC1061, *zce-726::Tn10*, *rneA14* (aaΔ 636-845), obtained from A.J. Carpousis; 19). Tetracycline resistant transductants were selected, and the presence of the *rneA14* mutation was confirmed by PCR using the RNE1 d(CTGGAAATGTCCCGTCAG) and RNE2 d(CACTTCCGGTTGCGGTTC) oligonucleotides. The chromosomal *lac* fusion was obtained by using the system previously described by Simons *et al.* (39). pMD217 has been previously described (31). This pTrc99a derivatives contain a *boxA* antitermination regulatory sequence inserted immediately downstream of the IPTG-inducible *P_{trc}* promoter. Oligonucleotides d(GCATAGATCTGCATTTACGTTGACACC) and d(CTGAAGATCTATCCGCCAAAACAGCC) were used in a PCR reaction (Pfu polymerase from Stratagene) with pMD217 to amplify a DNA segment located between nucleotides 2982 and 327 of the pTrc99a sequence. This region also includes the *lacI^f* gene. The PCR product was digested with BglII (BglII sites are present in both oligonucleotides) and cloned in pRS550 digested with BamHI to place the *lac* operon of pRS550 under the control of the *P_{trc}* promoter. Sequencing was performed to confirm the integrity of the fusion. The fusion was transferred to the chromosome by using λRS45 phage as described (39). Single copy integrations were confirmed by PCR as previously performed (34). pSK760 is a pBR322 derivative carrying the wild-type *rnhA* gene (11). pEM001 and pEM003 are pACYC184 derivatives that carry, respectively, the wild-type *rnhA* gene, or a mutated and inactive version of this gene (31). pMD306 is a pMD217 derivative carrying the 567 bp HindIII fragment from the *rrnB* operon downstream of the *P_{trc}* promoter (31).

Media and growth conditions. Cells were grown in VB Casa (Vogel-Bonner) minimal medium (11) supplemented with casamino acids (0.1%), glucose (0.2%), required amino acids (0.5%), thiamine (5 µg/ml), thymine (10 µg/ml). When needed, kanamycin was added to 25 µg/ml, chloramphenicol to 30 µg/ml, tetracycline to 10 µg/ml and ampicillin to 50 µg/ml.

Preparation of S30 extracts and *in vitro* translation experiments. S30 extracts from cells grown at 37 °C and transferred or not to 28 °C for 20 minutes, were prepared as described previously (27), aliquoted and stored at -80°C. *In vitro* translation experiments using the S30 extracts were

performed essentially according to a protocol from Promega (Technical bulletin TB219). The equivalent of 0.6 A₂₆₀ of S30 extracts were used in the *in vitro* translation reactions with either 4 µg of phage MS2 RNA template (from Roche Applied Sciences) or 10 µg of poly(U) RNA template (from GE Healthcare). When MS2 mRNA template was used, the reaction contained 20 µl of the S30 premix solution without amino acids (Promega), 15 µCi (1µl) of L-[³⁵S] methionine (GE healthcare) and 5 µl of the amino acids minus methionine mix (Promega). When poly(U) RNA template was used, the reaction contained 20 µl of the S30 premix solution without amino acids (Promega) and 0.25 µCi (5µl) of L-[¹⁴C]phenylalanine (GE Healthcare). To measure the translation background activity in the S30 extracts, MS2 mRNA and poly(U) RNA were omitted in some reactions. After 1 hour of incubation at either 37 °C or 28 °C, 3 ml of NaOH (1M) were added and the reactions were incubated on ice for 10 minutes. The reaction products were precipitated by adding 10 ml of an ice-cold solution containing 25% TCA (Trichloroacetic acid) and 2% casamino acids, and by incubating the tubes on ice for 30 minutes. The samples were deposited on 25 mm GF/B glass microfibre filters (Whatman), washed 3 times with 5% TCA and twice with 95% ethanol by using the Millipore 1225 sampling manifold system (Millipore). The filters were then dried at room temperature for 10 minutes. Filters were transferred to vials containing 10 ml of Cytoscint (MP Biomedicals) and L-[³⁵S] methionine or L-[¹⁴C]phenylalanine incorporation was measured in a scintillation counter (Beckman LS 6000 SC).

Sucrose density gradient fractionation of ribosomes and mRNA analysis. Cells were grown to log phase (OD₆₀₀ of ~0.5- 0.6) at 37 °C and transferred to 28 °C for 20 minutes. After exposure to 400 µg of chloramphenicol for 2 minutes, the cells were chilled briefly on ice and pelleted by centrifugation at 4000 rpm for 20 minutes at 4 °C (Beckman J2-MI, JA-14 rotor). They were then resuspended in 10 ml of lysis buffer without lysozyme (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 60 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20% sucrose), centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4 °C, resuspended in 500 µl of lysis buffer containing lysozyme (5 mg/ml) and stored at -80 °C. The cells were lysed by three rounds of freeze-thaw. 100 µl of 1% sodium deoxycholate, 50 µl of 6% Brij-58 and 20 units of RNase free DNase I (Roche Applied Sciences) were added to the lysates before incubating them on ice for 10 minutes. The lysates were clarified by centrifugation at 13000 rpm for 15 minutes at 4 °C. The equivalent of 35 OD₂₆₀ units were layered on 10-40% sucrose gradients made in 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl, 2 mM DTT and the gradients were centrifuged in a Beckman SW41 rotor at 35000 rpm for 3 hours at 4 °C. After centrifugation the gradients were connected to a density gradient fractionation system (ISCO), fractionated and recorded (ISCO UA-6 absorbance detector).

The gradients were fractionated into 1 ml fractions from which RNAs were recovered by first adding three volumes of 100% ethanol. After 1 hour at -80 °C, RNAs were pelleted by centrifugation at 13000 rpm for 15 minutes. The pellets were dried and resuspended in 50 µl of RNase-free deionized water. 300 µl of a solution made of 1.2 % SDS, 2.3 mM EDTA, 46.6 mM Na-Acetate pH 5.5 and 100 µg of proteinase K (Roche Applied Sciences) were then added before the mixtures were incubated for 30 minutes at 65 °C. RNAs from the mixtures were obtained by means of phenol chloroform (1:1) extraction and ethanol precipitation. Each RNA preparation was dissolved in 20 µl of RNase-free deionized water and stored at -80 °C. Northern blots were performed as described (14). The membranes were probed with the appropriate random prime-labelled DNA fragments obtained by PCR by using d(GGACGTCACATTACCGTGC) and d(GCACGTACCCATGCGCTACG) oligonucleotides for *crp*, d(GGCTGGCATTACAGACAG) and d(CTCTTCGCAGTTACGGTG) oligonucleotides for *yhdG*, and d(GAGCTGACAGAACTATGT) and d(CGCAGCGTACCACGGTTG) oligonucleotides for *fis*. Bands were detected by using a Phosphorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) with the ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

Time course of L-[³⁵S]cysteine incorporation. Cells were grown to log phase (OD₆₀₀ of ~0.5- 0.6) at 37 °C and transferred to 28 °C. After 20 minutes of incubation, 10 µCi/ml of L-[³⁵S]cysteine (GE Healthcare) were added to the cells. Aliquot of cells (500 µl) were recovered at various times as indicated and mixed with the same volume of cold non-radioactive cysteine (0.5%). After 10 minutes on ice the cells were recovered by centrifugation and resuspended in sodium dodecyl sulphate (SDS) loading buffer for lysis by boiling. The proteins were separated by SDS-polyacrylamide (10 %) gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare). Bands were detected and quantified by using a Phosphorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) with the ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

Plasmid extraction for supercoiling analysis. Cells were grown overnight at 37 °C and diluted to an OD₆₀₀ of 0.06 in prewarmed medium. They were grown to an OD₆₀₀ of ~0.5 at which time an aliquot of cells was recovered for plasmid extraction while the remaining culture was transferred to the indicated temperature. Aliquots of cells were recovered for plasmid extractions at various times as indicated. Growth was arrested by transferring cells into a tube filled with ice, thus immediately lowering the temperature of the culture to 0 °C. Plasmid DNAs were extracted by alkaline lysis as previously described (31).

Plasmid topoisomer analysis. Agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine was performed in 0.5 x TBE as described previously (31). After electrophoresis, the gels were dried and

prepared for *in situ* hybridization (31) with a random prime-labelled probe corresponding to the *bla* gene of pMD306. Band densities of topoisomers were quantified using a Phosphorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) with the ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

RNA extraction from cell cultures. RNA extraction from growing cells was performed by using TRIZOL reagent (Invitrogen) as described (2). Northern blots of RNA samples separated by electrophoresis in 1.2 % agarose gels containing formaldehyde were performed as described (14). End-labelled FIS 3' oligonucleotide (2) was used to detect *fis* mRNA (Fig. 5). *lacZ* mRNA was detected by using a random prime-labelled probe obtained by PCR using the oligonucleotides LACPCR5, d(CCGTCATAGCGATAACG) and LACPCR3, d(GCTGTTGACTGTAGCGG). *lacA* mRNA was detected by using a random prime-labelled probe obtained by PCR using the oligonucleotides LACA5', d(GATCGCATTGAACATGCC) and LACA3', d(CCGGTCGTTTATTTTCGCG). Bands were detected by using a Phosphorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) with ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

R-loop formation *in vitro*. pJP461 (33) and pTW120 (48) were purified from DH5 α cells by using the Plasmid Midi Kit (Qiagen). Hypernegatively supercoiled templates were prepared by transcription in the presence of DNA gyrase (John Innes Enterprises Ltd) as described (33). Following electrophoresis in agarose gel containing 7.5 μ g/ml chloroquine, we were able to estimate that more than 90% of the topoisomers were hypernegatively supercoiled (migration at the bottom of the gel as unresolved topoisomers). Transcription reactions (25 μ l) in 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT and 0.5 mg/ml BSA were performed in the presence of 20 units of T3 or T7 RNA polymerase (USB), 0.5 μ g of template DNA, 0.4 mM of each NTP and 2 μ Ci of both [³²P]-ATP and [³²P]-UTP (GE Healthcare, 3000 Ci/mmol). When indicated, RNase HI (20 ng) was added. Transcription reactions were incubated at 37 °C for 15 minutes. They were stopped by adding EDTA to 20 mM final. Samples were treated with 250 ng of RNase A for 1 hour at 37 °C. After phenol extraction, the samples were loaded on agarose gels (1%) in TBE buffer for electrophoresis. After staining with ethidium bromide and photography under UV light, gels were dried and exposed to a storage phosphor screen and RNA bands were revealed by using a Phosphorimager Typhoon 9400 (GE Healthcare) with ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

Table 1. *Escherichia coli* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source or Ref.
MA249	<i>ilv metB his-29 trpA9605 pro thyA deoB</i> (or <i>C</i>) <i>gyrB221</i> (cou ^R) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>zie-3163::Tn10kan</i>	14
MA251	<i>ilv metB his-29 trpA9605 pro thyA deoB</i> (or <i>C</i>) <i>gyrB221</i> (cou ^R) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>zie-3163::Tn10kan</i> <i>topA20::Tn10</i>	14
IB34	MA251 pSK760	This work
RFM445	<i>rpsL galK2 gyrB221</i> (cou ^R) <i>gyrB203</i> (Ts) Δ <i>lac74</i>	11
RFM475	<i>rpsL galK2 gyrB221</i> (cou ^R) <i>gyrB203</i> (Ts) Δ (<i>topA</i> <i>cysB</i>)204 Δ <i>lac74</i>	11
VU4	RFM475 pMD306	This work
VU7	VU4 pEM001	This work
VU8	VU4 pEM003	This work
PS63	RFM475 ϕ (<i>lacI</i> ^q - <i>P_{trc}-lac</i>)	This work
PS64	RFM445 ϕ (<i>lacI</i> ^q - <i>P_{trc}-lac</i>)	This work
PS66	PS63 pEM001	This work
PS68	PS63 pEM003	This work
PS70	PS64 pEM001	This work
PS72	PS64 pEM003	This work
PS123	PS63 <i>rne</i> Δ 14	This work
PS126	PS64 <i>rne</i> Δ 14	This work

5. RESULT

Growth rate of a *topA* null *gyrB*(Ts) mutant at low temperature correlates with restricted accumulation of hypernegatively supercoiled DNA.

To better understand the physiology of *topA* null cells following temperature downshifts, supercoiling levels must be measured at regular intervals during and after the transient growth inhibition. Indeed, still unknown is if the eventual growth resumption of *topA* null *gyrB*(Ts) cells accompanied by the accumulation of full-length RNAs (2) is related to changes in supercoiling levels. This question is also worth addressing considering the fact that GyrB proteins should remain active throughout incubation at low temperatures after the downshift. It is therefore possible that hypernegative supercoiling persists following the downshift, thus suggesting that it is not directly related to growth inhibition. On the other hand, if hypernegative supercoiling is directly involved in growth inhibition, it should be relaxed when growth resumes.

We asked whether transient growth inhibition is related to hypernegative supercoiling by comparing two *ΔtopA gyrB* (Ts) strains, VU7 and VU8, after a shift from the permissive temperature of 37 °C to 28 °C. Strain VU7 expresses RNase HI from plasmid pEM001; VU8 carries the vector pEM003 that has a mutated, inactive *rnhA* gene. As a supercoil reporter, both strains carry pMD306 (pMD306 contains the *lacI^q* gene, which stimulates R-loop-dependent hypernegative supercoiling; 4). Cell growth was monitored, and plasmid DNA was extracted at various times before and after temperature downshift. To observe hypernegative supercoiling, DNA samples were subjected to agarose gel electrophoresis in the presence of the DNA intercalator chloroquine. Topoisomers of pMD306 were then detected by hybridization with a specific probe. Temperature downshift caused a transient growth arrest (Fig. 1a, squares) and transient accumulation of hypernegative supercoils when RNase HI was not overproduced (strain VU8). Growth resumed 2 hrs after the shift, and the level of hypernegatively supercoiled DNA dropped. Overproduction of RNase HI (strain VU7) prevented significant accumulation of hypernegatively supercoiled DNA and growth inhibition (Fig. 1a, diamonds).

A more severe shift to 26 °C led to a greater accumulation of hypernegative supercoiling. Growth inhibition was similar to that observed at 28 °C but with a slightly longer lag (Fig. 1b, RNase HI not overproduced, squares). As seen with the shift to 28 °C, resumption of growth was accompanied by relaxation of hypernegatively supercoiled DNA. At 26 °C, overproduction of RNase HI failed to completely eliminate excess negative supercoiling, and the growth rate of the *topA* null strain (diamonds) was slightly lower than that of strain RFM445 (triangles), the isogenic *topA*⁺ *gyrB*(Ts) derivative.

Fig. 1a

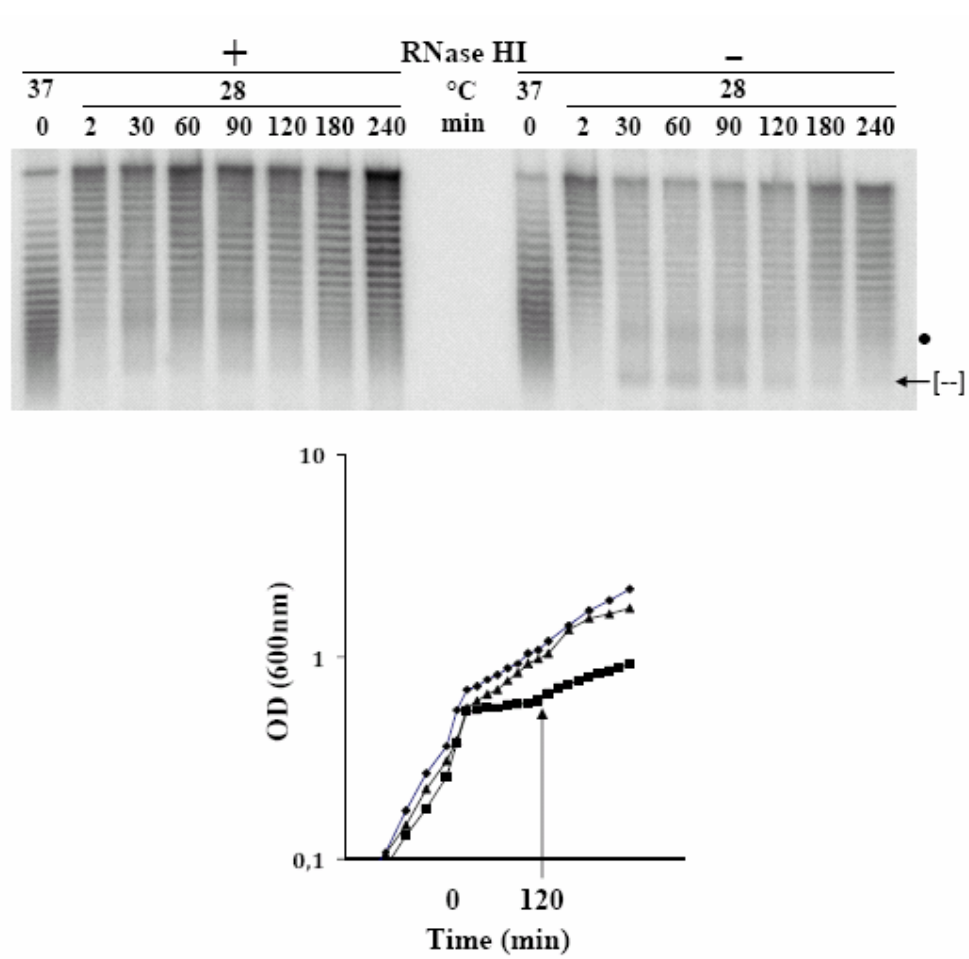


Fig. 1b

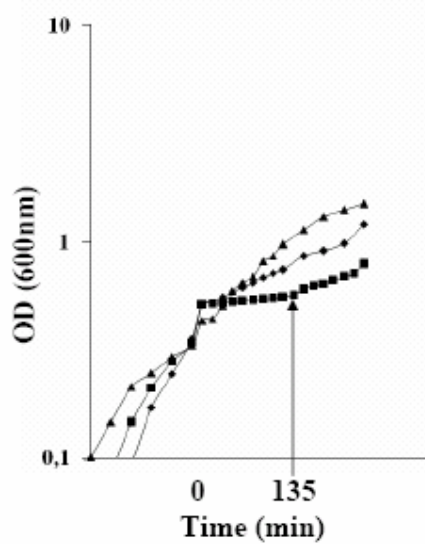
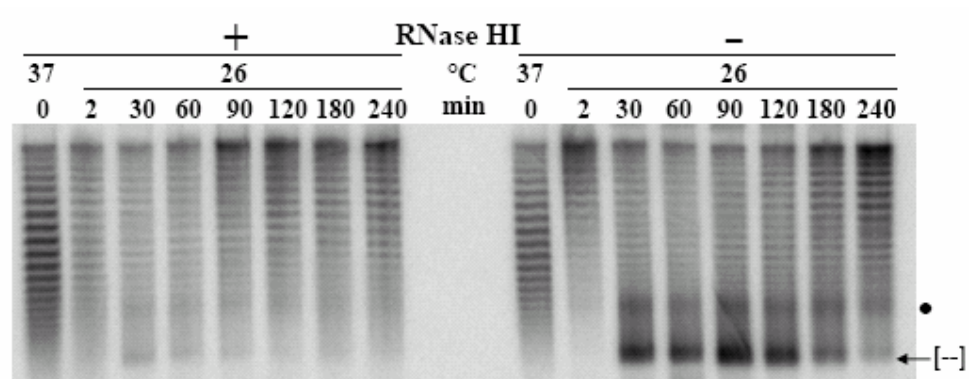


Fig. 1c

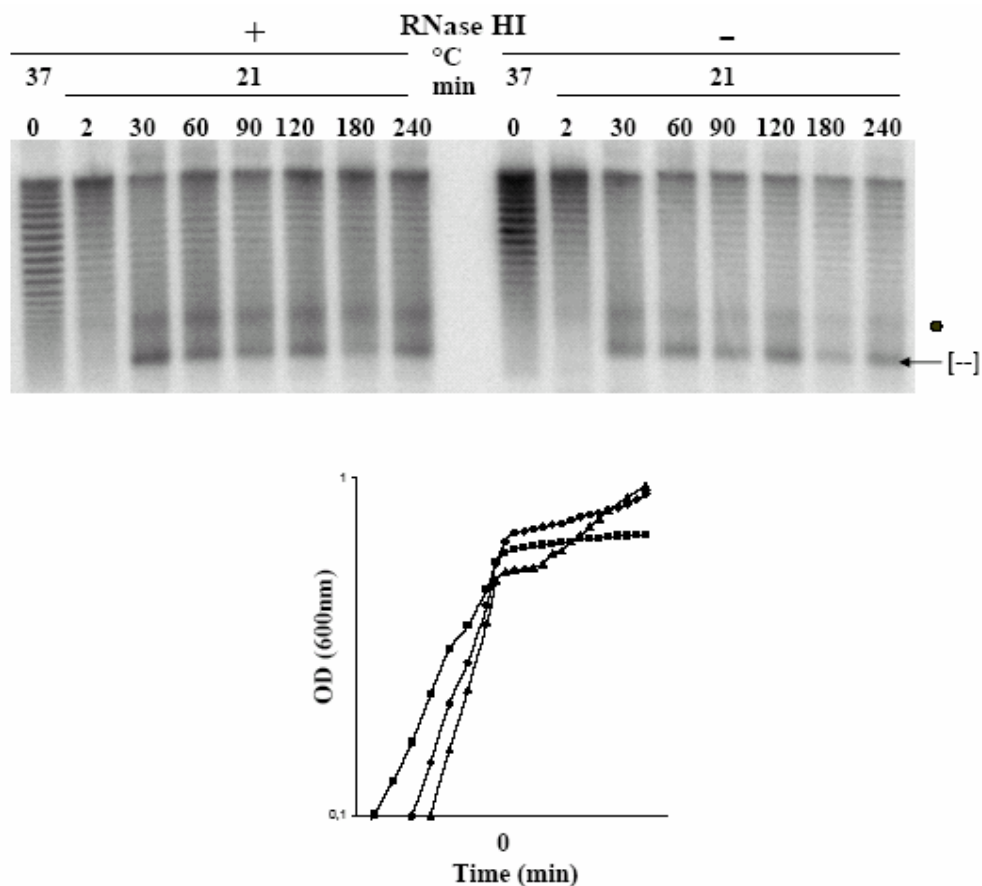


Figure 1. Correlation between hypernegative supercoiling and growth inhibition after temperature downshifts. Cells were grown at 37 °C to log phase as indicated in Materials and Methods before being transferred to 28 °C (a), 26 °C (b) or 21 °C (c). Plasmid DNA from the *topA* null strains was extracted just before the temperature downshift (time 0) and at the indicated times after the downshift. DNA was loaded on an agarose gel with 7.5 µg/ml of chloroquine and probed to reveal hypernegatively supercoiled pMD306 (top panels). Note that at this chloroquine concentration, the more relaxed topoisomers migrate faster, except hypernegatively supercoiled DNA, which also migrates rapidly (indicated by [--]). The dot points to a signal reflecting a negative supercoiling-dependent structural transition that was previously observed for this plasmid following 2-D gel analysis (4, 31). On the top of the gels, + and – respectively indicate that RNase HI was overproduced (pEM001) or not overproduced (pEM003). The arrow on the growth curves (bottom) indicates the time when growth resumed following the downshifts. VU7 (*gyrB*(Ts) *topA*/pMD306 and pEM001), ♦; VU8 (*gyrB*(Ts) *topA*/pMD306 and pEM003), ■; RFM445 (*gyrB*(Ts)), ▲.

In an even more severe shift to 21 °C, growth of the *topA* null strain not overproducing RNase HI (VU8) failed to resume, and the high level of hypernegatively supercoiled DNA persisted (Fig. 1c). In this case, overproduction of RNase HI (VU7) slightly reduced the proportion of hypernegatively supercoiled topoisomers, and cells grew, albeit at a significantly lower rate than seen with the isogenic *topA*⁺ *gyrB*(Ts) strain (Fig. 1c). Thus, the transient inability of downshifted *topA* null *gyrB*(Ts) cells to grow and accumulate full-length RNAs was related to hypernegative supercoiling. The ability of RNase HI to correct these problems was linked to its capacity to restrain hypernegative supercoiling.

Failure to accumulate full-length RNAs during growth inhibition of *topA* null *gyrB*(Ts) mutants at low temperature. We previously showed that rRNA synthesis can be defective in *topA* null *gyrB*(Ts) mutants (14). Since rRNA transcription and ribosome biogenesis are linked (5, 20), defective ribosomes could render RNA susceptible to ribonucleases, thus leading to RNA degradation (17). We examined the possibility that ribosomes of *topA* null *gyrB*(Ts) mutants were defective by measuring protein synthesis in S30 extracts from both *topA* null *gyrB*(Ts) and isogenic *topA*⁺ *gyrB*(Ts) cells. Cells were grown to log phase at 37 °C, and half of each culture was transferred to 28 °C. Translation initiation and elongation in S30 extracts were measured by following either L-[³⁵S]methionine or L-[¹⁴C]phenylalanine incorporation with phage MS2 RNA or poly(U) RNA, respectively, as templates. No significant difference was seen between the strains irrespective of temperature (data not shown). We conclude that ribosomes of *topA* null *gyrB*(Ts) cells are fully functional.

To further examine RNA features associated with growth inhibition, we examined *yhdG-fis* and *crp* mRNA (2). Previous work with whole-cell extracts showed that the *yhdG-fis* operon was overexpressed in the *topA* null *gyrB*(Ts) mutant at the low, non-permissive temperature and that RNAs corresponding to the proximal *yhdG* gene accumulated, whereas RNAs from the distal *fis* gene were barely detectable (2). In the *topA*⁺ strain or in the *topA* null mutant overproducing RNase HI, *yhdG-fis* operon expression was lower, but RNA corresponding to the distal *fis* gene was more abundant than RNA from the proximal *yhdG* gene (2).

To assess translatable RNA we used probes to detect RNA corresponding to the proximal *yhdG* gene and the distal *fis* gene in various ribosome fractions displayed by sucrose density-gradient centrifugation. The top panels of Fig. 2a show sedimentation profiles with the numbers indicating monosomes (1, one ribosome per mRNA) and polysomes (2, 3, 4; two or more ribosomes per mRNA). The relative distribution of *yhdG* RNA in the fractions was similar in all strains. Fig. 2b shows that *fis* RNA was easily detected in the ribosome fractions of both the *topA*⁺

strain and the *topA* null strain overproducing RNase HI, but such RNA was absent in fractions from the *topA* null strain not overproducing RNase HI. When present, *fis* RNA (Fig. 2b), but not *yhdG* RNA (Fig. 2a), was mostly found associated with the ribosomes (monosomes and polysomes), which probably reflects a stronger ribosome binding site for *fis* RNA (a strong ribosome binding site is expected for a gene encoding a very abundant protein such as Fis). Thus, less *fis* RNA was ribosome-associated in cells undergoing growth inhibition.

The *crp* gene was previously found to be expressed at the same level in all strains at the non-permissive temperature (2). However, in the *topA* null strain not overproducing RNase HI, full-length *crp* mRNA was barely detected, while short stable RNAs corresponding to the 5' portion of the gene accumulated. Fig. 3 shows the presence of *crp* RNA in the ribosome fractions of both *gyrB*(Ts) and *topA gyrB*(Ts) strains, but with much shorter RNA species detected in the ribosome fractions from the *topA* null strain not overproducing RNase HI (middle panel, lanes 5 to 12). When RNase HI was overproduced, longer RNAs were detected (right panel, lanes 5 to 12).

Figs. 2 and 3 also show that the ribosome profiles of the *topA* null *gyrB*(Ts) strain not overproducing RNase HI were very different from those of the other strains. Indeed a much larger proportion of monosomes were observed; polysomes were barely visible. This result indicated the presence of shorter translation-competent RNAs in the *topA* null *gyrB*(Ts) cells at the low, non-permissive temperature. In agreement with this interpretation, the preferential accumulation of monosomes was also observed when cellular RNA was extensively degraded due to overproduction of the endoribonuclease MazF in *E. coli* cells (50).

The failure to accumulate full-length RNAs suggested that protein synthesis would be inhibited in downshifted *topA* null *gyrB*(Ts) cells. In addition, the accumulation of short translatable RNAs at the expense of longer ones would favor the synthesis of small proteins over larger ones, as previously observed in cells overproducing the MazF (50) or ChpBK (51) endoribonucleases. To examine protein synthesis, proteins were labelled by adding L-[³⁵S]cysteine to the cell cultures at 28 °C. Proteins were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. We confirmed the previous finding (2) that protein synthesis rate is reduced in downshifted *topA* null *gyrB*(Ts) cells (data not shown). Fig. 4a shows one set of gels that was representative of three independent experiments. Ratios of large to small proteins were obtained by quantifying band intensities in all lanes in the two areas delimited by the brackets labelled large and small (Fig. 4a, left). Fig. 4b shows the results of the three independent experiments and demonstrates that the absence of topoisomerase I reduced the large/small ratio of proteins by about 40% at non-permissive temperature (compare squares, *topA*⁺ *gyrB*(Ts) with triangles, *topA* *gyrB*(Ts), for times 60 to 180 sec).

Fig. 2a

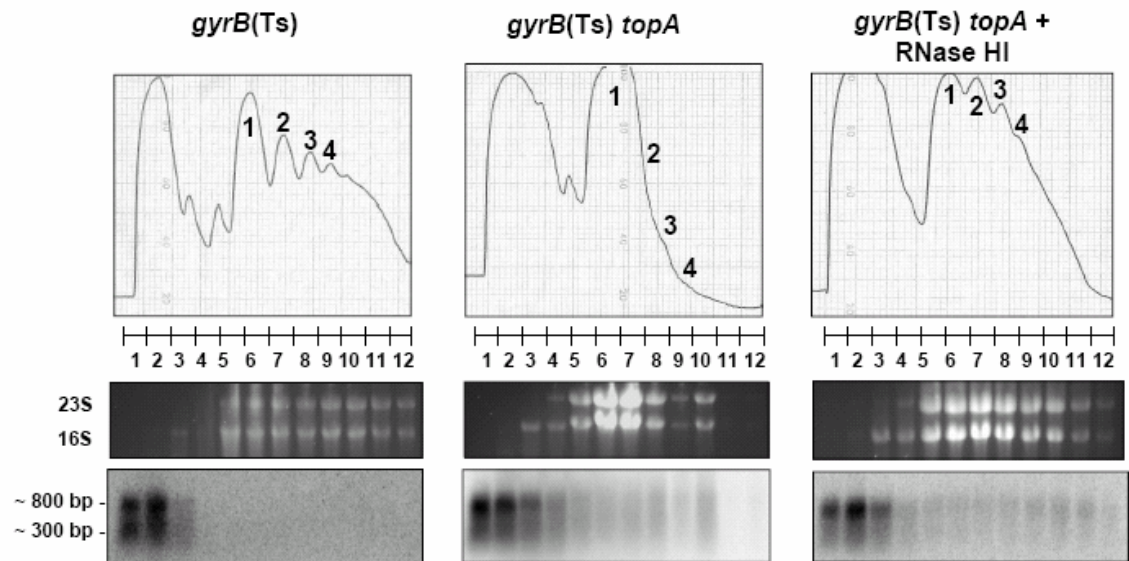


Fig. 2b

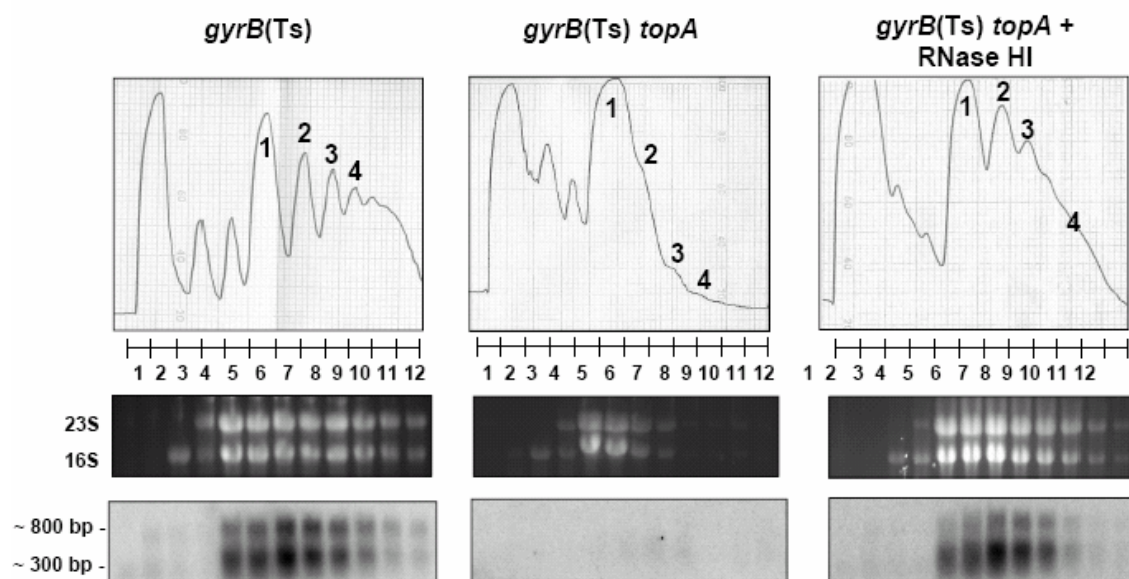


Figure 2. Association of *yhdG* and *fis* mRNAs with ribosomes after a temperature downshift. Cells were grown at 37 °C to log phase as indicated in Materials and Methods before being transferred to 28 °C. After 20 minutes, cells were recovered for sucrose gradient fractionation of ribosomes and mRNA analysis as described in Materials and Methods. Top panels show the ribosome profiles (A₂₆₀) with the numbers pointing to the peaks corresponding to monosomes (1, one ribosome per RNA) and to polysomes (2, 3, 4; two or more ribosomes per RNA). The numbers below the ribosome profiles correspond to the different fractions from which the RNA was extracted. The middle panels show the ethidium bromide stained gels with 23S and 16S rRNA. These gels were used for Northern blot analysis as described in Materials and Methods with probes corresponding to *yhdG* (a) or to *fis* (b). The strains used are MA249 (*gyrB(Ts)*), MA251 (*gyrB(Ts) topA*) and IB34 (*gyrB(Ts) topA/pSK760*). + RNase HI indicates that RNase HI was overproduced (pSK760).

Fig. 3

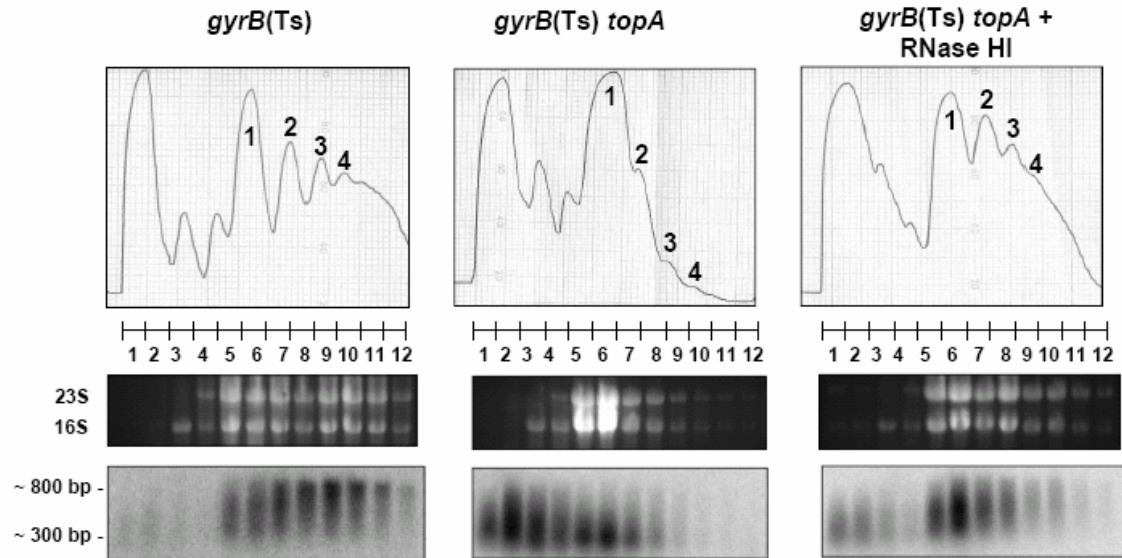


Figure 3. Association of *crp* mRNAs with ribosomes after a temperature downshift. Cells were grown and recovered for sucrose gradient fractionation of ribosomes and mRNA analysis as described in the legend to Figure 2. Top, middle and bottom panels are as described in the legend to Figure 2. The probe used for the Northern blot analysis corresponds to *crp*.

Fig. 4

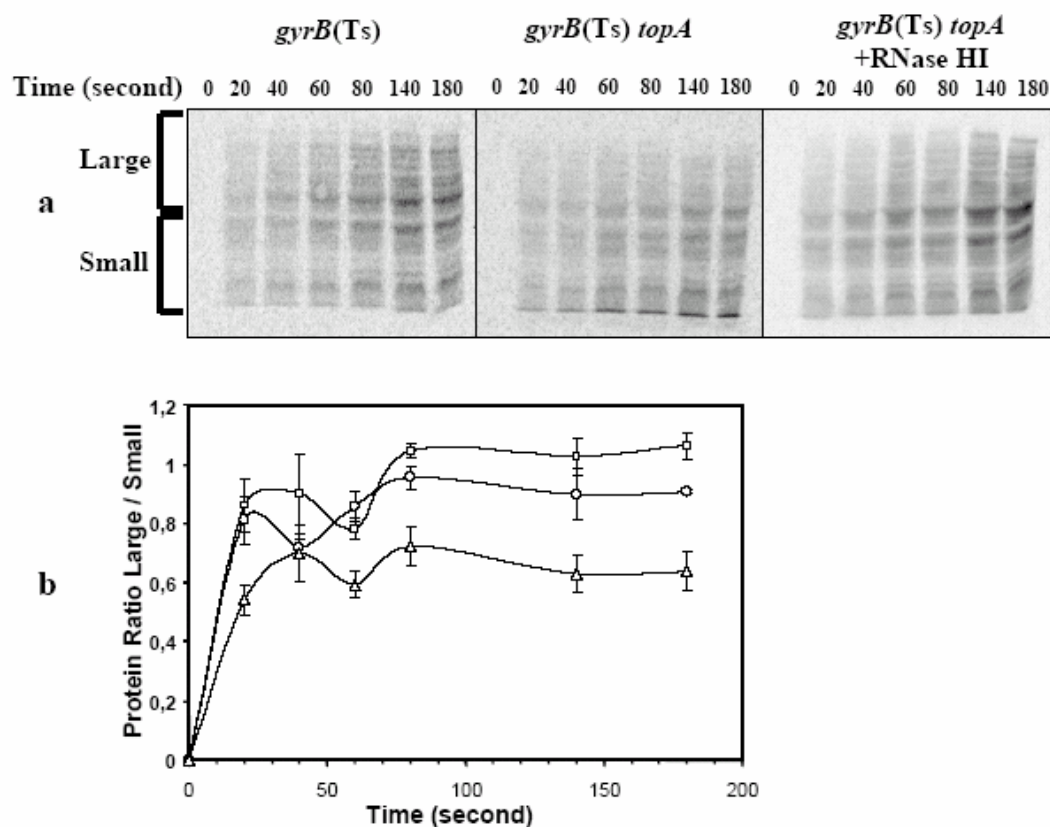


Figure 4. Protein synthesis after a temperature downshift. Cells were grown at 37 °C to log phase before being transferred to 28 °C. After 20 minutes, L-[³⁵S]cysteine was added and aliquots were recovered at different times to follow protein synthesis as described in Materials and Methods. Samples were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis as described in Materials and Methods. Shown in (a) is the result of one experiment. The two area delimited by the brackets respectively labelled large and small were chosen to calculate the large/small ratios graphically represented in (b) (three independent experiments). MA249 (*gyrB(Ts)*), □; MA251 (*gyrB(Ts) topA*), Δ; IB34 (*gyrB(Ts) topA/pSK760*), ○.

Collectively, the data indicate that a failure to accumulate full-length RNAs caused a shortage of appropriate templates in *topA* null *gyrB*(Ts) cells, thereby leading to protein synthesis impairment and growth inhibition.

Incorrect processing and degradation of *fis* and *lac* RNAs in *topA* null *gyrB*(Ts) mutants at low temperature. An inability to accumulate full-length RNAs might be related to either premature termination of transcription or to RNA degradation. In previous work, 5' proximal probes were used to address the possibility that *topA* null *gyrB*(Ts) cells synthesize truncated RNAs at the non-permissive temperature (2). Here, we used probes corresponding to internal regions of *yhdG-fis* and *lac* operons to address the possibility that RNA is synthesized but degraded in *topA* null *gyrB*(Ts) cells at the non-permissive temperature.

yhdG-fis RNA is normally processed by an endonucleolytic cleavage to generate two RNA species in which the longer one corresponds to *fis* and the shorter one to *yhdG* (3). To follow the processing of *yhdG-fis* RNA at the non-permissive temperature, rifampicin was added to cell cultures previously transferred to 28 °C, and RNA was extracted at various times. RNA was then probed with an oligonucleotide corresponding to the 3' end of the *fis* gene. As expected, *yhdG-fis* RNA was processed to give the RNA carrying *fis* both in *topA*⁺ (Fig. 5, lanes 1 to 6) and in *topA*⁻ cells overproducing RNase HI (Fig. 5, lanes 13 to 18). However, in *topA*⁻ cells not overproducing RNase HI, *yhdG-fis* RNA was more slowly processed, a smear was clearly visible, and the RNA corresponding to *fis* was barely detected (Fig. 5, lanes 7 to 12). Thus, *fis* RNA was synthesized in *topA*⁻ cells not overproducing RNase HI, but it was incorrectly processed.

We previously used 5' probes to demonstrate that *topA* null *gyrB*(Ts) cells accumulate truncated *lacZ* RNAs at the non-permissive temperature (2). In agreement with this finding, β -galactosidase synthesis was dramatically reduced in these cells. Here, we used a random-primed probe corresponding to the 3' region of the *lacZ* gene to detect *lacZ* RNA degradation. To facilitate detection of *lac* RNAs by Northern blot analysis, we placed the *lac* operon under control of the strong IPTG-inducible *P_{trc}* promoter on the chromosome of isogenic strains. Fig. 6 (top panel) shows that *lacZ* RNA was synthesized but extensively degraded in *topA* null *gyrB*(Ts) cells when RNase HI is not overproduced (lane 2). We next followed the synthesis of *lacA*, the third and last member of the *lac* operon. *lacA* RNA is normally produced following successive endonucleolytic cleavages of *lac* RNA by RNase P and RNase E in the intergenic region between *lacY* and *lacA* (21). Fig. 6 (bottom panel) shows accumulation of correctly processed *lacA* RNA in *topA*⁻ cells overproducing RNase HI (lane 1). However, *lacA* RNA was detected as a smear in *topA*⁻ cells not overproducing RNase HI (lane 2). Thus, although *lac* RNA was synthesized in *topA*⁻ cells not overproducing RNase HI, it was not correctly processed and was degraded, as was the case for *fis*

RNA. These data indicate that the failure to accumulate full-length RNAs in *topA* null *gyrB*(Ts) cells is due largely to altered processing and degradation. Extensive R-loop formation could inhibit normal RNA processing and instead lead to RNA degradation by RNase HI (see below and Discussion).

RNase E is not responsible for the extensive RNA degradation in *topA* null *gyrB*(Ts) mutants at low temperature. RNase E (*rne*) is the major endoribonuclease involved in RNA degradation in *E. coli* (18). To examine RNase E involvement in RNA degradation of *topA* null *gyrB*(Ts) mutants at non-permissive temperature, we introduced the *rneΔ14* mutation into isogenic *topA*⁺ and *topA*⁻ strains carrying the *lac* operon under control of the *P_{trc}* promoter (among viable *rne* mutations, *rneΔ14* is best able to stabilize the otherwise very unstable *lacZ* mRNA synthesized by T7 RNA polymerase (19)). The *rneΔ14* slightly promoted the accumulation of RNA products hybridizing to the *lacA* probe in *topA*⁺ cells (Fig. 7, compare lane 1, *rne*⁺ with lane 3, *rneΔ14*). In *topA*⁻ cells, the *rneΔ14* mutation promoted accumulation of *lacA* degradation products but not normal *lacA* RNA (Fig. 7, compare lane 5, *rne*⁺ with lane 7, *rneΔ14*). Thus, RNase E does not initiate *lacA* RNA degradation in *topA* null *gyrB*(Ts) mutants at the non-permissive temperature. Similar results were obtained for *fis* RNA (not shown).

To examine whether extensive RNA degradation requires *de novo* synthesis of a ribonuclease following the temperature downshift, cells were treated with the translation inhibitor, spectinomycin, five min before transfer from 37 to 28 °C. Truncated *lacA* RNAs accumulated whether or not spectinomycin was added to cultures of both *rne*⁺ and *rneΔ14*-derivatives of *topA* null mutants (Fig. 7, compare lanes 5 and 7, minus spectinomycin with, respectively, lanes 6 and 8, plus spectinomycin). However, addition of spectinomycin caused a significant reduction in the amount of RNA detected with the *lacA* probe in all strains (Fig. 7, compare lanes 1, 3, 5 and 7, minus spectinomycin with, respectively, lanes 2, 4, 6 and 8, plus spectinomycin). We attribute this reduction to polarity effects (1, 46), which are expected to more severely affect *lacA*, the last gene of the operon. Moreover, in *topA*⁺ cells, the addition of spectinomycin strongly promoted the accumulation of larger RNA species (Fig. 7, compare lane 1 with lane 2, respectively minus and plus spectinomycin). This is in agreement with the previously described stabilizing effects of translation inhibitors on mRNAs due to the titration of RNase E, presumably by unstable rRNAs that are overproduced when protein synthesis is inhibited (24). Thus, extensive RNA degradation in *topA*⁻ cells does not require the *de novo* synthesis of a ribonuclease following the temperature downshift. Rather, the temperature downshift may lead to extensive accumulation of RNA substrates for a pre-existing ribonuclease, other than RNase E.

Fig. 5

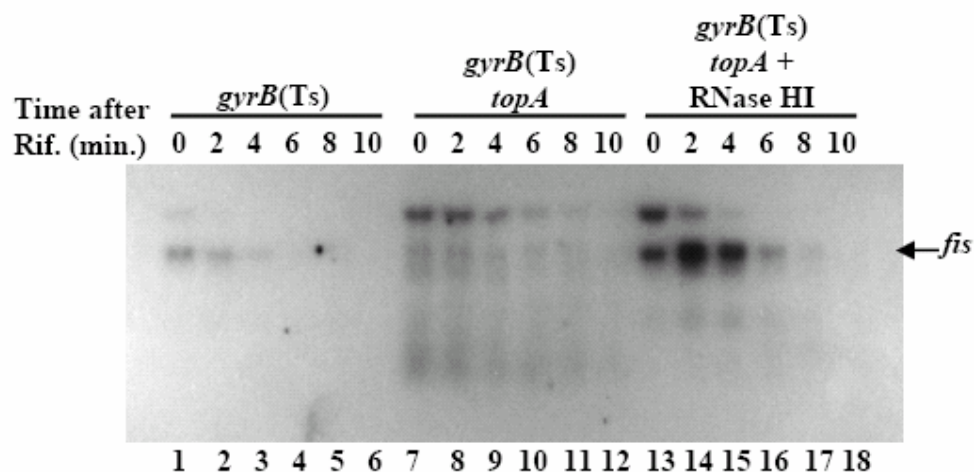


Figure 5. Expression and processing of *fis* mRNAs after a temperature downshift. Cells were grown at 37 °C to log phase as indicated in Materials and Methods before being transferred to 28 °C. After 20 minutes, rifampicin at 250 µg/ml (final concentration) was added to the cells, and the RNA was extracted at the indicated time (for time 0 the RNA was extracted immediately before the addition of rifampicin). Ten µg of RNA samples were used for Northern blot analysis with an oligonucleotide probe hybridizing to *fis* as described in Materials and Methods. The strains used are MA249 (*gyrB*(Ts)), MA251 (*gyrB*(Ts) *topA*) and IB34 (*gyrB*(Ts) *topA*/pSK760). + RNase HI indicates that RNase HI was overproduced (pSK760).

Fig. 6

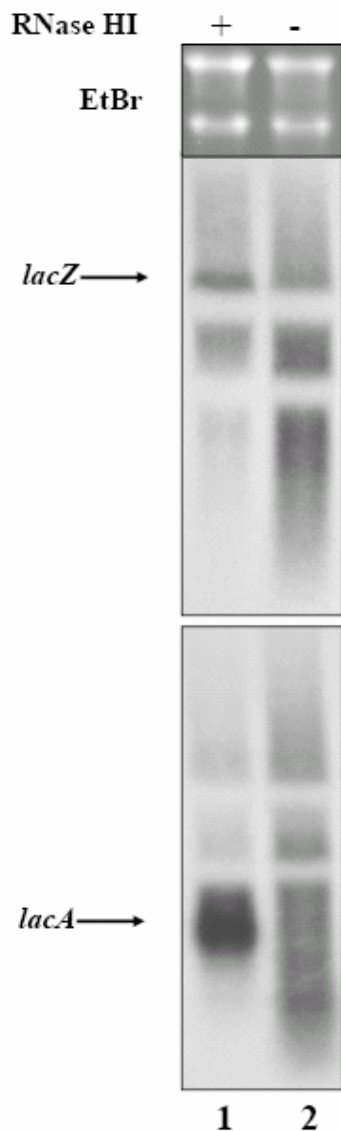


Figure 6. Expression and processing of *lac* mRNAs after a temperature downshift. Cells were grown at 37 °C to log phase as indicated in Materials and Methods before being transferred to 28 °C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to 1 mM to induce *lac* expression from the chromosomal *P_{trc}-lac* fusion, and 30 minutes later aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction. The strains used are PS66 (*gyrB*(Ts) *topA* Δ (*lacI*^q-*P_{trc}-lac*)/pEM001) and PS68 (*gyrB*(Ts) *topA* Δ (*lacI*^q-*P_{trc}-lac*)/pEM003). + and – respectively indicate that RNase HI was overproduced (pEM001) or not overproduced (pEM003). Fifteen μ g of RNA were used for Northern blot analysis with random prime-labelled probes hybridizing to *lacZ* (top panel) or *lacA* (bottom panel) as described in Materials and Methods.

Fig. 7

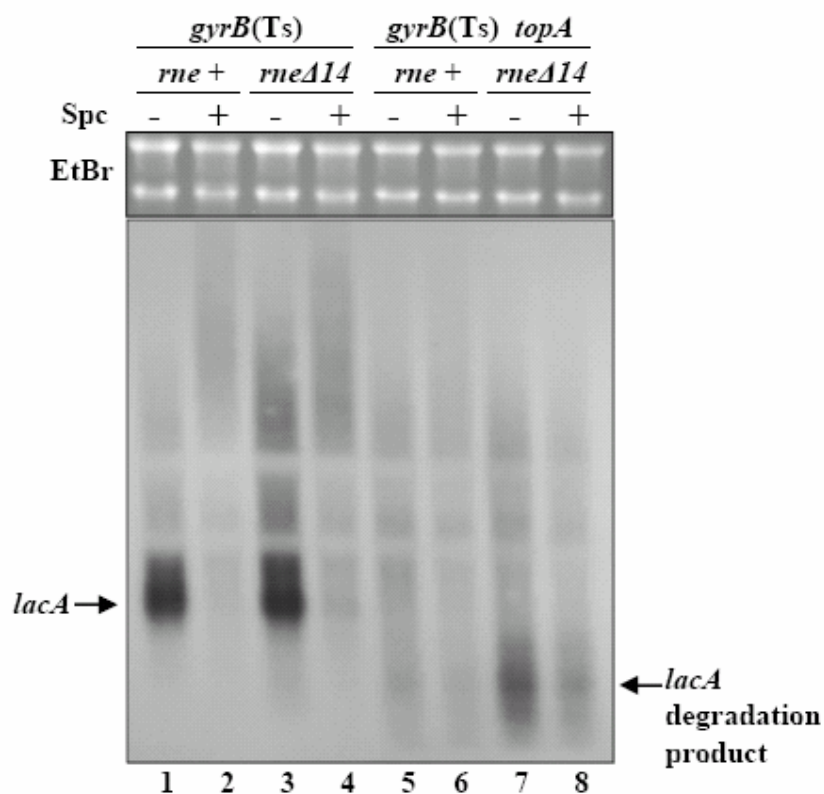


Figure 7. The effects of *rne114* and spectinomycin on the processing of *lacA* mRNAs after a temperature downshift. Cells were grown at 37 °C to log phase as indicated in Materials and Methods. Spectinomycin (final concentration, 400 µg/ml) was added to one-half of the culture and 5 minutes later the cells were transferred to 28 °C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to 1 mM to induce *lac* expression from the chromosomal *P_{trc}-lac* fusion, and 30 minutes later aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction. The strains used are PS63 (*gyrB*(Ts) *topA* Δ(*lacI*^q-*P_{trc}-lac*), PS64 (*gyrB*(Ts) Δ(*lacI*^q-*P_{trc}-lac*), PS123 (*gyrB*(Ts) *topA* Δ(*lacI*^q-*P_{trc}-lac* *rne114*) and PS126 (*gyrB*(Ts) Δ(*lacI*^q-*P_{trc}-lac* *rne114*). Spc is spectinomycin.

***In vitro* transcription of hypernegatively supercoiled templates leads to extensive R-loop formation.** The observation that growth resumption coincided with DNA relaxation suggested that *hypernegative* supercoiling is tightly linked to RNA degradation. Furthermore, DNA supercoiling can directly affect RNA features only by acting during transcription. Based on experimental evidence, we recently proposed a self-promoting cycle of R-loop formation involving gyrase and RNase HI that ultimately leads to hypernegative supercoiling. In this model, transcription of hypernegatively supercoiled templates leads to extensive and non-sequence specific R-loop formation (9).

Two plasmids were examined that allowed transcription of a cloned DNA insert from either the physiological or the reverse orientation by the use of T7 or T3 RNA polymerase, respectively. Plasmid pJP461, which carries the 567 bp HindIII fragment of the *E. coli rrnB* operon, exhibits a small amount of R-loop formation in its physiological orientation (31, 33). A second plasmid, pTW120 (48), carries 41 highly G-rich repeats of the mouse Sy3 class switch region that allow efficient formation of stable R-loops (6, 15, 47, 48). Stable R-loops significantly formed on templates having wild-type supercoiling levels only when the 41 repeats of the mouse Sy3 class switch region were transcribed in their physiological, G-rich orientation, as shown by the RNase HI-sensitive gel retardation of pTW120 during electrophoresis (Fig. 8, top panel compare lane 11, - RNase HI with lane 12, + RNase HI). However, these R-loops were short since only a very faint plasmid-associated radioactive RNA signal was detected (Fig. 8, lane 11, bottom panel).

When hypernegatively supercoiled templates were transcribed, extensive R-loop formation occurred with each transcribed sequence (Fig. 8, lanes 5, 7, 13, and 15). This R-loop formation was accompanied by a strong radioactive RNA signal, reflecting the presence of long R-loops. A loss of preference for G-rich regions was indicated by the fact that R-loop formation was detected irrespective of the transcription orientation of the cloned DNA fragments and the RNA polymerase used (T3 or T7). Consequently, transcription of hypernegatively supercoiled DNA templates promotes extensive, sequence-independent R-loop formation. In this context, the presence of RNase HI could lead to extensive RNA degradation and could explain the failure of *topA* null *gyrB*(Ts) cells to accumulate full-length RNAs at the non-permissive temperature (see Discussion).

Fig. 8

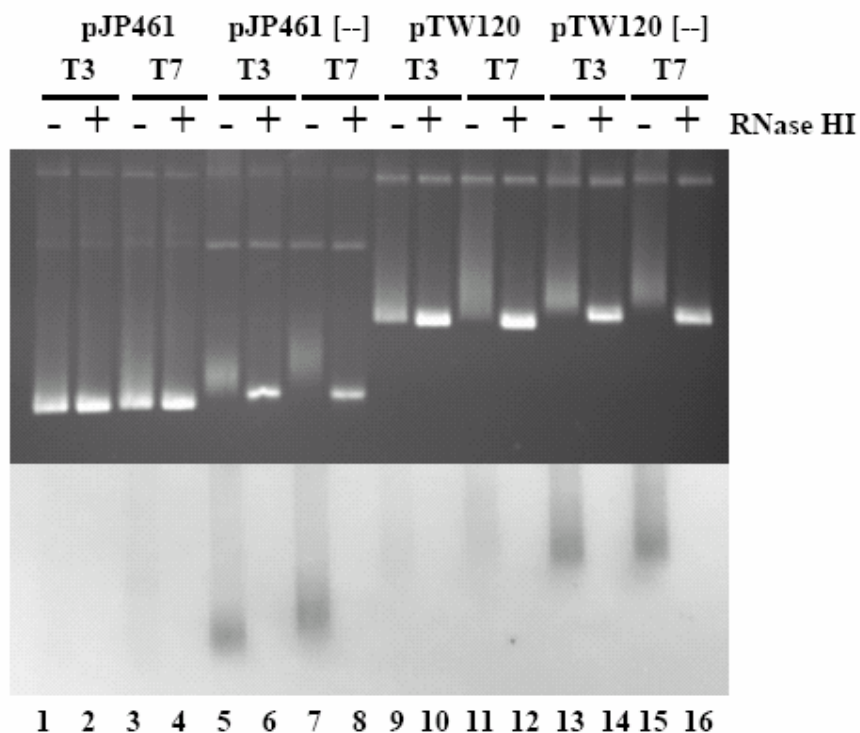


Figure 8. R-loop formation on hypernegatively supercoiled templates *in vitro*. *In vitro* transcription reactions were performed as described in Materials and Methods in the presence of both $^{[32]}\text{P}$ -UTP and $^{[32]}\text{P}$ -ATP. Samples were loaded on an agarose gel without chloroquine. The bottom panel is the autoradiography of the gel to reveal RNA in R-loops. [--] indicates hypernegatively supercoiled templates.

6. DISCUSSION

Mechanism of growth inhibition by hypernegative supercoiling. Two pathways exist by which *topA* mutants acquire hypernegative supercoiling. One involves an imbalance between gyrase and the relaxing enzymes, topoisomerases I and IV that allows negative supercoils to accumulate due to restricted DNA rotation associated with transcription (twin-domain model). The other involves formation of RNase HI-sensitive R-loops behind transcription complexes. The latter appears to be involved in the transient accumulation of hypernegative supercoils and growth inhibition that occurs when a *topA* null mutant is shifted to low temperature. Overproduction of RNase HI alleviates both (Fig. 1). Accumulation of truncated RNAs at the expense of full-length functional RNAs then impaired protein synthesis and inhibited growth. When hypernegative supercoiling was relaxed, full-length functional RNAs accumulated, and growth resumed. As expected, restoration of the ribosome profile, i.e. the emergence of polysomes at the expense of monosomes, accompanied growth resumption (not shown). Thus the known sensitivity of *topA* null mutants to low temperature (30, 42) is due to accumulation of hypernegatively supercoiled DNA that then triggers RNA degradation.

Inhibition of topoisomerase IV significantly stimulated the accumulation of hypernegatively supercoiled DNA in *topA* null mutants, suggesting that this topoisomerase is involved in removal of hypernegative supercoiling (44). We found that hypernegative supercoiling becomes more stable as temperature decreases (Massé *et al.*, unpublished results). It may be that topoisomerase IV preferentially loses activity under these conditions. With various *topA* null strains containing or lacking compensatory mutations, we observed a correlation between growth inhibition and hypernegative supercoiling at low temperature (28, 30). The dissimilar extent of RNA degradation, determined by the level of hypernegative supercoiling present in these various strains, may explain their different growth rates.

The data presented above also explain the paradoxical observation that overproduction of RNase HI, an enzyme that degrades RNA, allows the accumulation of full-length RNAs. Overproduction of RNase HI limits the accumulation of hypernegatively supercoiled DNA, thereby preventing extensive RNA degradation. We have found that hypernegatively supercoiled DNA accumulates during a very short time interval following the downshift, after which it persists due to inefficient relaxation (Usongo *et al.*, unpublished results). Therefore, RNase HI activity must be high enough in the cell to efficiently inhibit hypernegative supercoiling within a narrow time window. Although our *in vivo* and *in vitro* data suggest that RNase HI overproduction acts by preventing the formation of hypernegatively supercoiled DNA (10, 29, 31, 33), it may also promote

the rapid removal of these topoisomers. For example, by limiting the formation of hypernegatively supercoiled DNA, RNase HI overproduction may prevent the saturation of topoisomerase IV activity, thereby facilitating relaxation of hypernegative supercoils.

Origin of RNA degradation. Although the exact mechanism that links hypernegative supercoiling to RNA degradation is not fully characterized, our data allow us to discard several possibilities. Experiments with the *rneΔ14* mutation indicated that RNase E is not responsible for the extensive RNA degradation occurring in the *topA* null *gyrB*(Ts) mutant at low temperatures. As expected, we found that the *rneΔ14* mutation did not improve the growth of this *topA* mutant (not shown).

In vitro transcription of hypernegatively supercoiled templates generated extensive, sequence-independent R-loop formation. Therefore hypernegative supercoiling in the *topA* mutant may also lead to extensive sequence-independent R-loop formation. RNA in the R-loops can then be degraded by RNase HI, thus explaining the failure to accumulate full-length RNAs and subsequent growth inhibition. Interestingly, fragments on the 3' side of RNase HI cleavage carry a monophosphorylated 5' terminus. Such RNAs are preferred substrates for the 5'-end-dependent RNase E, as opposed to mRNAs that normally have a triphosphorylated 5' terminus (26). This could explain the rapid degradation in the *topA* mutant of RNAs from *fis* and *lacA* that correspond to the distal part of polycistronic RNAs. This would also be compatible with the observation that the *rneΔ14* mutation significantly promoted the accumulation of truncated *lacA* RNAs in the *topA* mutant.

Fragments from the 5' side of RNase HI cleavage can be degraded from their 3' end by exoribonucleases such as PNPase and RNase II (18). Interestingly, we found that RNAs such as *yhdG* that correspond to the proximal part of operons tend to accumulate in *topA* null mutants at the non-permissive temperature (2, and Baaklini *et al.*, unpublished observation). The activity of the cellular exoribonucleases may become saturated due to the rapid degradation of RNAs by RNase HI. In agreement with this interpretation, we found that overproducing PNPase or RNase II reduced accumulation of RNAs that corresponded to the proximal part of both monocistronic and polycistronic RNAs (Hraiky *et al.*, unpublished observation). Thus, the apparent 3' to 5' RNA decay in the *topA* null mutant, as opposed to the normal 5' to 3' pathway initiated by the binding of RNase E to the 5' end of mRNAs (18), would be compatible with RNase HI, not RNase E, initiating RNA decay in *topA* null cells after temperature downshifts.

Therefore, according to our model, R-loops inhibit normal RNA processing as RNase E do not have access to RNA in RNA-DNA hybrids. However, such R-loops are targets for RNase HI thus leading to RNA degradation. When there is no hypernegatively supercoiled DNA (at 37 °C or

when RNase HI is sufficiently overproduced) extensive R-loop formation is prevented and there is no significant RNA degradation. This explains why the RNA pattern in *topA*⁻ cells overproducing RNase HI is normal. The level of RNase HI activity required to efficiently inhibit gyrase-mediated hypernegative supercoiling is much higher than the level required to degrade the RNA in R-loops, because RNase HI must compete with the strong supercoiling activity of gyrase following downshifts. RNase HI activity becomes toxic only in the presence of hypernegatively supercoiled DNA, because it then leads to extensive RNA degradation. In *topA*⁺ cells, where the supercoiling level is normal, the wild-type level of RNase HI activity is sufficient to rapidly eliminate the few R-loops that form during transcription.

A more direct test of RNase HI involvement in RNA degradation in *topA* mutants would involve inactivating the *rnhA* gene: deleting *rnhA* should allow the accumulation of full-length functional RNAs, and it should correct the growth problems of *topA* mutants at non-permissive temperatures. Although double *topA rnhA* null mutants cannot be constructed (11, 30), we have shown that depletion of RNase HI activity in *topA* null cells eventually leads to extensive DNA relaxation, segregation defects, and growth inhibition (44). Extensive DNA relaxation was related to a cellular response leading to gyrase inhibition, possibly to protect cells from the deleterious effect of R-loop-dependent hypernegative supercoiling by gyrase. We found that *topA* null mutants depleted in RNase HI activity accumulated normal full-length RNAs following temperature downshifts (Sanscartier *et al.*, unpublished observation). Segregation problems leading to growth inhibition were likely due to replication defects related to the lack of RNase HI activity (44).

Although our data are compatible with a direct involvement of RNase HI in RNA degradation in *topA* mutants, we cannot exclude the contribution of a yet unknown mechanism triggered by hypernegative supercoiling. Such a mechanism, however, must be consistent with the finding that *de novo* protein synthesis is not required for RNA degradation following temperature downshifts. As stated in the Results section, several of the phenotypes seen for the *topA* null mutants following temperature downshifts are reminiscent to toxin-antitoxin (TA) systems such as MazEF (50) or ChpBIK (51). In these systems, the stable toxin (an endoribonuclease) is produced from a polycistronic RNA that also encodes the unstable antitoxin. Conditions that inhibit the expression of the polycistronic RNA, such as the addition of protein synthesis inhibitors including spectinomycin, lead to the rapid elimination of the antitoxin, thus allowing the endoribonuclease to degrade RNA. However, our observation that the RNA degradation phenotype of *topA* null cells exposed to spectinomycin at 37 °C is still only observed when such cells are transferred to 28 °C (2 and Baaklini and Drolet, unpublished results) is not easily explained by the induction of a TA system.

Transcription arrest may also be a mechanism by which R-loops inhibit gene expression (2, 9, 14). With yeast, such a mechanism has been proposed (16) and recently supported by the results of *in vitro* experiments (43). With *E. coli*, pulse-labelling experiments showed that the rate of rRNA synthesis is reduced in *topA* null *gyrB*(Ts) cells not overproducing RNase HI at the non-permissive temperature (14). Therefore, in *E. coli*, R-loops could act as roadblocks for RNA polymerases transcribing highly expressed genes, such as those encoding rRNA (*rrn* operons).

Recovery of growth. The transient growth inhibition shown in Fig. 1 is also observed with partially defective topoisomerase I: strain RS2 (41), when shifted from 37 °C to 17 °C, undergoes a 7-hr growth lag (K. Drlica, unpublished observation). This lag is alleviated by a compensatory *gyrB* mutation (strain SD7, ref. 7), which suggests that gradual reduction of gyrase activity may restore growth in *topA* mutants. It will now be interesting to determine whether the cellular response leading to gyrase inhibition when RNase HI activity is depleted in *topA* mutants (44) contributes to the recovery of growth at low temperature.

7. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant FNR 12667 from the CIHR to M.D and NIH grants AI35257, AI63431, and AI73491 to K.D. M.D. was a Chercheur-Boursier Senior from the FRSQ.

We thank A.J Carpousis for the strain carrying the *rne114* mutation and Robert Crouch for the RNase HI used in the *in vitro* transcription experiments. We also thank Patrick Hallenbeck for editing of the manuscript.

8. REFERENCES

1. Adhya, S., and M. Gottesman. 1978. Control of transcription termination. *Annu. Rev. Biochem.* **47**:967-996.
2. Baaklini, I., C. Hraiky, F. Rallu, Y.-C. Tse-Dinh, and M. Drolet. 2004. RNase HI is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**:198-211.
3. Ball, C. A., R. Osuna, K. C. Ferguson, K., and R. C. Johnson. 1992. Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:8043-8056.
4. Broccoli, S., F. Rallu, P. Sanscartier, S. M. Cerritelli, R. J. Crouch, and M. Drolet. 2004. Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced supercoiling and associated R-loop formation. *Mol. Microbiol.* **52** :1769-1779.
5. Condon, C., C. Squires and C. L. Squires. 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **59**:623-645.
6. Daniels, G. A., and M. Lieber. 1995. RNA:DNA complex formation upon transcription of immunoglobulin switch regions: implications for the mechanism and regulation of class switch recombination. *Nucleic Acids Res.* **23**:5006-5011.
7. DiNardo, S., K. A. Voelkel, R. Sternglanz, A. E. Reynolds, and A. Wright. 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**:43-51.
8. Drlica, K., and M. Snyder. 1978. Superhelical *Escherichia coli* DNA: relaxation by coumermycin. *J. Mol. Biol.* **120**:145-154.
9. Drolet, M. 2006. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol. Microbiol.* **59**:723-730.
10. Drolet, M., X. Bi, and L. F. Liu. 1994. Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**:2068-2074.
11. Drolet, M., P. Phoenix, R. Menzel, E. Massé, L. F. Liu, and R. J. Crouch. 1995. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:3526-3530.
12. Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, and H. A. Nash. 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* **73**:3872-3876.

13. Gellert, M., M. H. O'Dea, T. Itoh, and J. Tomizawa. 1976. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:4474-4478.
14. Hraiky, C., M. A. Raymond, and M. Drolet. 2000. RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**:11257-11263.
15. Huang, F. T., K. Yu, C. L. Hsieh, and M. R. Lieber. 2006. Downstream boundary of chromosomal R-loops at murine switch regions: implications for the mechanism of class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:5030-5035.
16. Huertas, P., and A. Aguilera. 2003. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol. Cell* **12**:711-721.
17. Iost, I., and M. Dreyfus. 1995. The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J.* **14**:3252-3261.
18. Kushner, S. R. 2005. mRNA decay and processing. p. 327-345. *In* N. P. Higgins. (ed.), *The Bacterial Chromosome*. ASM Press, Washington, DC.
19. Leroy, A., N. F. Vanzo, S. Sousa, M. Dreyfus, and A. J. Carpousis. 2002. Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol. Microbiol.* **45**:1231-1243.
20. Lewicki, B. T., T. Margus, J. Remme, and K. H. Nierhaus. 1993. Coupling of rRNA transcription and ribosomal assembly *in vivo*. Formation of active ribosomal subunits in *Escherichia coli* requires transcription of rRNA genes by host RNA polymerase which cannot be replaced by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **231**:581-593.
21. Li, Y., and S. Altman. 2004. Polarity effects in the lactose operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **339**:31-39.
22. Liu, L. F., and J. C. Wang. 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:7024-7027.
23. Lodge, J. K., T. Kazic, and D. E. Berg. 1989. Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J. Bacteriol.* **171**:2181-2187.
24. Lopez P.J., I. Marchand, O. Yarchuk and M. Dreyfus. 1998. Translation inhibitors stabilize *Escherichia coli* mRNAs independently of ribosome protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6067-6072.
25. Lynch, A. S., and J. C. Wang. 1993. Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for

- export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.* **175**:1645-1655.
26. Mackie, G. A. 1998. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**:720-723.
 27. Mackie, G. A. Donly, B. C. And Wong, P. C. (1990) In Spedding, G. (ed.), *Ribosomes and Protein Synthesis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, UK.
 28. Massé, E., and M. Drolet. 1999. Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **274**:16654-16658.
 29. Massé, E., and M. Drolet. 1999. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J. Biol. Chem.* **274**:16659-16664.
 30. Massé, E., and M. Drolet. 1999. R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J. Mol. Biol.* **294**:321-332.
 31. Massé, E., P. Phoenix, and M. Drolet. 1997. DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**:12816-12823.
 32. Miller, J. H. 1992. *A short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 33. Phoenix, P., M. A. Raymond, E. Massé, and M. Drolet. 1997. Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **272**:1473-1479.
 34. Powell, B. S., M. P. Rivas, D. L. Court, Y. Nakamura and C. L. Jr. Turnbough. 1994. Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res.* **23**:1278.
 35. Pruss, G. J. 1985. DNA topoisomerase I mutants. Increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in DNA supercoiling. *J. Mol. Biol.* **185**:51-63.
 36. Pruss, G. J., and K. Drlica. 1986. Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8952-8956.
 37. Pruss, G. J., S. H. Manes, and K. Drlica. 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**:35-42.
 38. Samul, R., and F. Leng. 2007. Transcription-coupled hypernegative supercoiling of plasmid DNA by T7 RNA polymerase in *Escherichia coli* topoisomerase I-deficient strains. *J. Mol. Biol.* **374**:925-935.
 39. Simons, R. W., F. Houman, and N. Kleckner. 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**:85-96.

40. Spirito, F., and L. Bossi. 1996. Long-distance effect of downstream transcription on activity of the supercoiling-sensitive leu-500 promoter in a *topA* mutant of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **178**:7129-7137.
41. Sternglanz, R. S. DiNardo, K. A. Voelkel, Y. Nishimura, Y. Hirota, K. Becherer, L. Zumstein, and J. C. Wang. 1981. Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**:2747-2751.
42. Stupina, V. A., and J. C. Wang. 2005. Viability of *Escherichia coli topA* mutants lacking DNA topoisomerase I. J. Biol. Chem. **280**:355-360.
43. Tous, C., and A. Aguilera. 2007. Impairment of transcription elongation by R-loops *in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **360**:428-432.
44. Usongo V., F. Nolent, P. Sanscartier, C. Tanguay, S. Broccoli, I. Baaklini, K. Drlica and M. Drolet. 2008. Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation. Mol. Microbiol. **69**:968-981
45. Wei, Y., J. M. Lee, C. Richmond, F. R. Blattner, J. A. Rafalski, and R. A. LaRossa. 2001. High-density microarray-mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183**:545-556.
46. Yarchuk, O., N. Jacques, J. Guillerez, and M. Dreyfus. 1992. Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the *lacZ* gene. J. Mol. Biol. **226**:581-596.
47. Yu, K., F. Chedin, C. L. Hsieh, T. E. Wilson, and M. R. Lieber. 2003. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. Nat. Immunol. **4**:442-451.
48. Yu, K., D. Roy, M. Bayramyan, I. S. Haworth and M. R. Lieber. 2005. Fine-structure analysis of activation-induced deaminase accessibility to class switch region R-loops. Mol. Cell. Biol. **25**:1730-1736.
49. Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, S. Bachellier, R. Schneider, D. Chen, D. M. Lilley, and N. R. Cozzarelli. 2000. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **275**:8103-8113.
50. Zhang Y., J. Zhang, K. P. Hoefflich, M. Ikura, G. Qing, and M. Inouye. 2003. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. Mol. Cell **12**:913-923.
51. Zhang Y., L. Zhu, J. Zhang, and M. Inouye. 2005. Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **280**:26080-26088.

Liens entre l'article 1 et l'article 2

Dans le premier article, nous apportons des réponses à certaines questions soulevées dans notre projet de recherche, notamment l'origine des ARNm courts, la façon dont la synthèse protéique est inhibée et le mécanisme par lequel la surproduction de la RNase HI agit sur la croissance dans des souches déficientes en topoisomérase I. Dans le second article, nous cherchons à comparer les effets des R-loops sur l'expression génique dans des souches déficientes en topoisomérase I et en RNase HI. On sait depuis de nombreuses années que des R-loops sont formés en absence de RNase HI. Ces R-loops sont responsables de phénomènes de recombinaison associés à la réplication. Pourtant, aucune étude n'a été effectuée sur les effets de ces R-loops sur l'expression génique. D'après les résultats du premier article, il semble que les R-loops sont instables en absence de topoisomérase I. En absence de RNase HI, on sait que les R-loops sont stables. Il serait donc intéressant de comparer les effets des R-loops dans les deux souches mutantes. Nous pourrions ainsi mieux cerner quelles sont les conséquences possibles des R-loops sur la transcription et sur l'expression génique dans son ensemble.

III. ARTICLE 2

RNase HI activity is required for optimal gene expression in *Escherichia coli*.

Charles Fortin, Imad Baaklini and Marc Drolet¹

Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ.
Centre-ville, Montréal, P. Québec, Canada, H3C 3J7

¹Corresponding author

Phone : 514-343-5796

FAX: 514-343-5701

Electronic mail address: marc.drolet@umontreal.ca

Running title: RNase HI in gene expression.

Key words: *Escherichia coli*, RNase HI, heat-shock, R-loop, RNA-DNA hybrid

CONTRIBUTIONS

Dans cet article, j'ai tout d'abord reproduit la majorité des résultats afin de confirmer leur validité. Il s'agit des dosages de la β -galactosidase, des courbes de survie à haute température, des Northern blots de *lacZ* et de *crp* et des Westerns blots de sigma32 à haute température. Pour compléter les travaux, j'ai aussi effectué des expériences sur la survie du mutant *recG* à haute température, ainsi qu'un Western blot de sigma32 à haute température dans ce mutant. De plus, j'ai dosé la synthèse de la β -galactosidase dans le mutant *recA* et le double mutant *rnhA* et *recA*. Finalement, j'ai réalisé une analyse d'expression génique dans le mutant *rnhA* à 28°C en utilisant la technique des puces à ADN. Les dernières expériences effectuées nous ont permis de terminer le travail et de le présenter dans sa version finale.

1. RÉSUMÉ

Chez *Escherichia coli*, le gène *rnhA* code pour la RNase HI, une enzyme qui dégrade la partie ARN d'un R-loop. Une des fonctions de cette enzyme est de conférer la spécificité de l'initiation de la réplication au site *oriC*, en prévenant la formation de R-loops ailleurs sur le chromosome. La létalité du double mutant *recB rnhA* suggère aussi un rôle des R-loops et de la RNase HI dans la réparation de l'ADN. De plus, le double mutant *topA rnhA* n'est pas viable. Le gène *topA* code pour la topoisomérase I, une enzyme qui interagit avec l'ARN polymérase pour inhiber la formation de R-loops pendant la transcription. La surproduction de la RNase HI corrige les défauts de croissance d'un mutant *topA*, tout particulièrement dans les conditions de stress. En effet, la surproduction de RNase HI est capable de restaurer l'expression des gènes de résistance aux stress aussi bien que celle des gènes non reliés aux stress. Ces résultats suggèrent un rôle important de la RNase HI dans l'expression génique. Dans le présent travail, nous avons réalisé une série d'expériences pour tester cette hypothèse. Dans la première série d'expériences, nous montrons que le mutant *rnhA* croît plus lentement qu'une souche de type sauvage, et qu'il atteint sa phase stationnaire avec une densité cellulaire inférieure à celle d'une souche *rnhA*⁺. Comme dans un mutant *topA* qui ne surproduit pas la RNase HI, on observe des défauts de croissance et d'expression génique dans le mutant *rnhA*, illustrés par une diminution dans la synthèse de β -galactosidase et par une baisse dans l'expression de l'ARNm *crp*. Dans une autre série d'expériences, nous avons étudié la sensibilité du mutant *rnhA* aux stress de hautes températures. Cette fois-ci encore, le mutant *rnhA* est sensible aux stress de hautes températures comme l'est le mutant *topA* qui ne surproduit pas la RNase HI. Nos résultats indiquent que cette sensibilité aux stress de hautes températures est causée par un défaut dans l'induction de la synthèse de protéines de stress, elle-même causée par un défaut dans l'expression de gènes de stress et un défaut d'accumulation du facteur σ_{32} . Ce défaut dans l'expression génique ne semble pas être causé par le cSDR. En effet, la surproduction de RecG dans le mutant *rnhA* ne corrige pas ce phénotype. Nous montrons aussi qu'une mutation qui inactive le facteur Rho dans le mutant *rnhA* rend cette souche très malade, ce qui suppose que le facteur Rho devrait être impliqué dans l'élimination des R-loops. L'ensemble de nos résultats suggèrent que la formation de R-loops inhibe l'expression génique dans les conditions de croissance normale et durant les stress, et que des facteurs comme la topoisomérase I, la RNase HI et Rho sont requis pour éliminer ces R-loops ou prévenir leur formation.

2. SUMMARY

The *rnhA* gene of *Escherichia coli* encodes RNase HI, an enzyme that specifically degrades the RNA moiety of an R-loop. One function of this enzyme is the prevention of DNA replication initiation at sites, where R-loops presumably form, other than the normal origin, *oriC*. The lethality of double *recB rnhA* null mutants also suggests a role for R-loops and RNase HI in repair. In addition, double *topA rnhA* mutants are non-viable. The *topA* gene encodes DNA topoisomerase I, an enzyme that interacts with RNA polymerase to inhibit R-loop formation during transcription. RNase HI overproduction is able to rescue the growth defect of *topA* mutants, especially under stressful conditions, and to restore the expression of both stress- and non-stress-related genes. This result may also suggest a role of RNase HI in gene expression. In this work, we have performed a series of experiments to test this hypothesis. First, we found that *rnhA* mutants grow more slowly than wild-type cells and reach the stationary phase at a lower cell density. As shown for *topA* null mutants not overproducing RNase HI, a defect in growth and gene expression is illustrated by a decrease in the rate of β -galactosidase synthesis and a lower level of *crp* mRNA in the *rnhA* mutants. In the second set of experiments, we have studied the sensitivity of *rnhA* mutants to heat shock. Once again, like *topA* null mutants not overproducing RNase HI, we found them to be sensitive to heat-related stresses. Our results indicate that this sensitivity is due to a defect in heat shock proteins-induced synthesis that correlates with a reduced rate of both heat shock gene mRNAs and sigma32 accumulation, following heat treatments. Also, our results indicates that cSDR is not directly involved in the inhibition of gene expression in this mutant strains. Indeed, the overproduction of RecG did not correct this phenotype. In addition, our finding that a *rho* mutation makes an *rnhA* mutant very sick, suggests that Rho might also be involved in R-loops removal. All together, our results imply that R-loop formation, especially under stress, can significantly impede gene expression and that trans-acting factors, such as topoisomerase I, RNase HI and Rho, are required to remove them or to prevent their formation.

3. INTRODUCTION

RNases H are ubiquitous enzymes that specifically degrade the RNA of RNA-DNA hybrids (Crouch and Dirksen, 1982; Hostomsky *et al.*, 1993; Ohtani *et al.*, 1999). RNA-DNA hybrids are sometimes formed *in vivo* by annealing of nascent transcript to the complementary DNA strand leading to the formation of R-loops and leaving the second DNA strand single-stranded. In *Escherichia coli*, the *rnhA* gene encodes RNase HI. One function of this enzyme is the removal of R-loops that can otherwise be used as alternative origins of replication (Kogoma, 1997; Kogoma and Foster, 1998), restricting replication initiation to the normal and regulated origin, *oriC*. In addition, the lethality of double *recB rnhA* null mutants suggests a role for R-loops and RNase HI in DNA repair (Itaya and Crouch, 1991a; Kogoma *et al.*, 1993). This is also supported by the observation that the SOS response is chronically induced in *rnhA* mutants (Kogoma *et al.*, 1993). These results imply that R-loops and RNase HI are involved in DNA replication and repair, though the underlying mechanism(s) for these functions is/are unknown. Moreover, in the case of the involvement of RNase HI in DNA repair indirect effects through gene expression cannot be excluded.

In addition to *recB*, the *topA* gene encoding DNA topoisomerase I, the enzyme responsible for the relaxation of transcription-induced negative supercoiling (Wang, 2002; Drolet *et al.*, 2003), is required for the survival of *rnhA* mutants (Drolet *et al.*, 1995; Massé and Drolet, 1999b). Failure to eliminate such negative supercoiling leads to formation of R-loops, as RNase HI overproduction is able to correct the growth problem of *topA* null mutants (Drolet *et al.*, 1995). R-loops exert their inhibitory effects on the growth of *topA* null mutants at least in part by impeding transcription. Indeed, rRNA synthesis was shown to be dramatically impaired in *topA* null mutants unless RNase HI was overproduced (Hraiky *et al.*, 2000). Moreover, the failure to accumulate full-length mRNAs was recently correlated with the growth inhibition of *topA* null mutants when RNase HI was not overproduced (Baaklini *et al.*, 2004). In addition, the sensitivity of *topA* null mutants to heat shock (Qi *et al.*, 1996) can be alleviated by overproducing RNase HI, which also restore the expression of HSP (Heat Shock Protein) genes (Cheng *et al.*, 2003). The involvement of topoisomerase I in the inhibition of R-loop formation is consistent with the fact that DNA opening, promoted by negative supercoiling, is required for the nucleation step. This explains the observation that the *rnhA* gene becomes essential in the absence of topoisomerase I, i.e. double *topA rnhA* null mutants are non-viable (Drolet *et al.*, 1995).

Because of the synthetic lethality of *rnhA* and *topA* double mutant strains, it seems likely that R-loops are generated to some extent when wild-type DNA topoisomerase I is

active and that some of the problems found in *topA* mutants may also be exhibited in *rnhA* mutant strains. Here we report that *rnhA* mutants possess many of the growth and gene expression phenotypes associated with the loss of *topA* function, though less severe in the case of the *rnhA* mutants. Indeed, like *topA* null mutants not overproducing RNase HI, we found that the expression of both stress and non-stress-related genes is impeded in the absence of RNase HI. These results strongly suggest that one important function of RNase HI is, indeed, to remove R-loops that can otherwise interfere with gene expression. We also present genetic evidence for a similar role of the Rho protein.

4. RESULT

Growth and β -galactosidase synthesis are perturbed in the absence of RNase HI.

To study the effects of the absence of RNase HI on growth and gene expression, we have used isogenic strains that differ in their *rnhA* genes. RFM430 (Table 1) possesses a wild-type *rnhA* gene, the second (PH379) carries an *rnhA* null allele (*rnhA-339::cat*), and the third (MD317) has the *rnhA224* allele, a nonsense mutation that results in no more than 0.5% of the normal level of RNase HI activity (Itaya and Crouch, 1991b). pSK760, a multicopy plasmid bearing a wild-type *rnhA* gene or pSK762c, which has a mutated inactive *rnhA* gene, were introduced into MD317. With these isogenic strains, it was possible to examine allele-specific effects and to confirm by complementation (pSK760) that the observed phenotypes were directly related to the *rnhA* mutation.

If R-loop formation is mostly related to the supercoiling level of the template, one can predict that it should be generally non-specific and therefore, that it should also affect growth rate and survival under various conditions. Both predictions were recently met for a *topA* null mutant when RNase HI was not overproduced (Cheng *et al.*, 2003; Baaklini *et al.*, 2004). Figure 1 shows that the growth rate of *rnhA* mutants is reduced by 40 to 50% relative to isogenic wild-type strains whether the cells were grown at 37 or 28°C. Moreover, it can also be seen that *rnhA* mutants reach the stationary phase of growth at a lower cell density than wild-type cells.

In a recent study, the strong growth inhibition of a *topA* null mutant not overproducing RNase HI was shown to be accompanied by an almost complete loss in the ability to synthesize β -galactosidase upon induction by IPTG (Baaklini *et al.*, 2004). We have therefore measured the ability of *rnhA* mutants to synthesize β -galactosidase following temperature changes, that correspond to the conditions we used to study the classical heat shock response in these mutants (see below). In all cases, β -galactosidase synthesis was reduced by 2 to 6-fold in the *rnhA* mutants relative to isogenic wild-type strains (Fig. 2). In the *topA* null mutant, the very low level of *crp* gene expression was shown to be largely responsible for the dramatic drop in the rate of β -galactosidase synthesis (Baaklini *et al.*, 2004). We have performed Northern blot experiments to measure *crp* expression in our isogenic strains under conditions that parallel those for the β -galactosidase assays. Whereas the level of *crp* mRNA fluctuates in the wild-type strains, it remains low throughout the time in the isogenic *rnhA* mutants (Fig. 3). Interestingly, as is the case for the β -galactosidase synthesis (Fig. 2), the RNase HI effect on *crp* expression is maximal 30 min following the transfer to 28 °C.

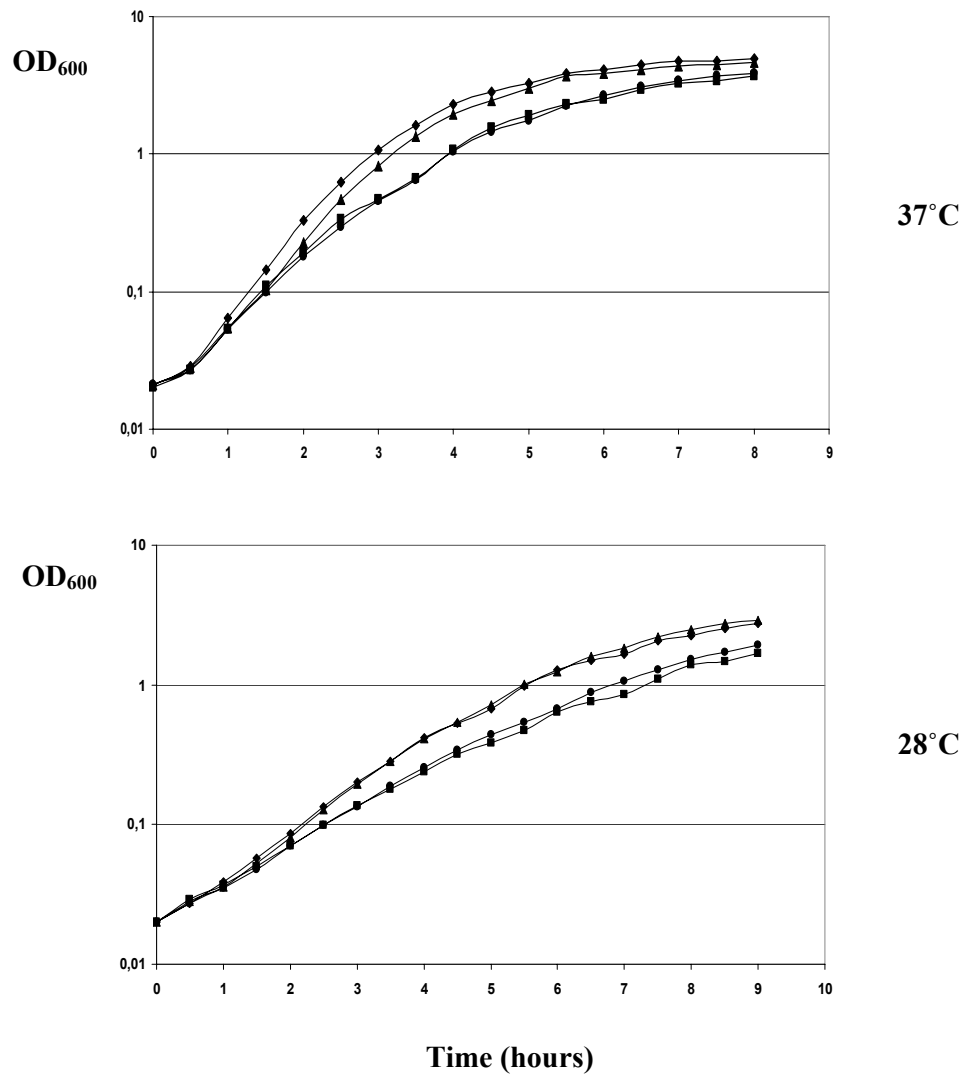


Figure 1. The effect of the temperature on the growth of *rnhA* mutants. Cell growth in LB was monitored by measuring the OD₆₀₀ with a Shimadzu spectrophotometer (model UV160U) through time (min) at 37 and 28 °C. Overnight cultures were grown at the experimental temperature. RFM430, ◆; RFM430 *rnhA::cam*, ■; RFM430 *rnhA224* + pSK760, ▲; RFM430 *rnhA224* + pSK762c, ●. The results shown here are representative of two independent experiments.

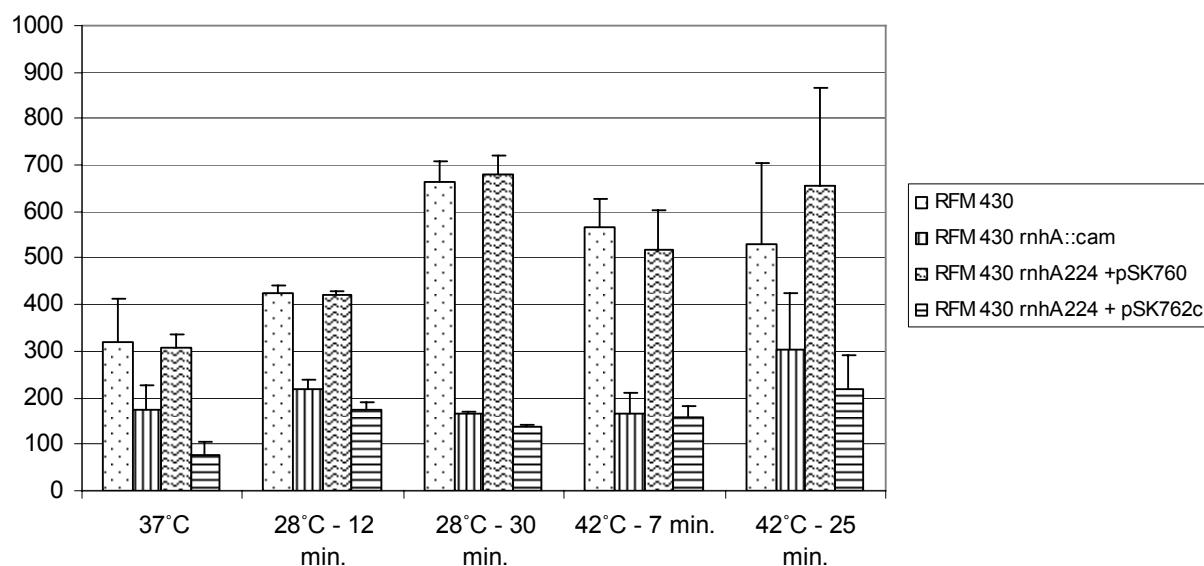


Figure 2. β -galactosidase synthesis in *rnhA* mutants. Cells were grown at 37°C as described in *Experimental Procedures* to an OD₆₀₀ of about 0.4. Cell samples (2 ml) were taken at 37 °C just before the transfer to 28 °C, 2 and 20 min after the transfer to 28 °C and 2 and 20 min after the transfer from 28 to 42 °C (the cells were transferred at 42 °C after 30 min of incubation at 28 °C). β -galactosidase synthesis was induced by adding IPTG (1 mM) for 5 min. (samples at 37 and 42 °C) or 10 min. (samples at 28 °C) at the temperature from which the samples were taken. For each time point the columns from left to right correspond to: RFM430, RFM430 *rnhA::cam*, RFM430 *rnhA224* + pSK760 and RFM430 *rnhA224* + pSK762c. The results of three independent experiments are included here.

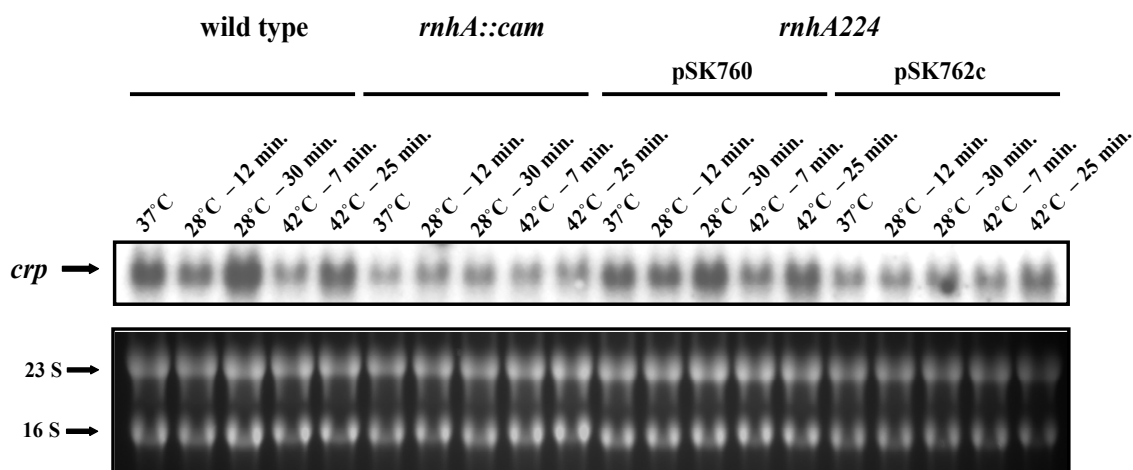


Figure 3. *crp* mRNA level in *rnhA* mutants. Cells were grown at 37°C as described in Experimental Procedures to an OD₆₀₀ of about 0.4. Cell samples were taken at 37 °C just before the transfer to 28 °C, 12 and 30 min after the transfer to 28 °C and 7 and 25 min after the transfer from 28 to 42 °C (the cells were transferred at 42 °C after 30 min of incubation at 28 °C) for RNA extraction. Northern blot analysis was performed as described in Experimental Procedures with the oligonucleotide CRP2 probe.

Therefore, like the *topA* null mutant, the lower rate of β -galactosidase synthesis in the *rnhA* mutants relative to wild-type cells, can be largely explained by a drop in the level of *crp* mRNA, at least for this time point (28°C, 30 min.). Also similar to the *topA* null mutant, both β -galactosidase synthesis and *crp* expression fail to recover following the temperature downshift in the *rnhA* mutants (Fig. 3, compare wild-type and *rnhA*, 28°C, 12 and 30 min.).

The “classical” heat shock response is delayed in rnhA mutants.

In the “classical” heat shock response, the cells rapidly adapt to a non-lethal increase in temperature by transiently inducing the synthesis of Heat Shock Proteins (HSPs), such as DnaK and GrpE. σ 32, encoded by *rpoH*, is responsible for transcription of genes required for resistance to heat-related stresses, including the HSP genes (Yura *et al.*, 2000). In the “classical” heat shock response, the accumulation of σ 32 is not related to *de novo* transcription of *rpoH* but rather involves both stabilization of σ 32 and increased translation of *rpoH* mRNA (Morita *et al.*, 1999; Yura *et al.*, 2000).

We have performed experiments to study the “classical” heat shock response in the absence of RNase HI. Figure 4a (middle panel) shows a time course of *dnaK* mRNA accumulation following a transfer of the cells from 28 to 42 °C. In wild-type cells, *dnaK* mRNA synthesis is clearly apparent two min. following the heat shock, it reaches a peak after 5 min. and has declined after 10 min. However, in the case of the *rnhA* mutants the response is clearly delayed. Indeed, *dnaK* mRNA is barely visible two min. after the heat shock and the decline is not observed after 10 min. In fact, we found that the level of *dnaK* mRNA has declined in the *rnhA* mutant when an RNA sample was extracted 20 min after the temperature switch (not shown). Western blot analysis of DnaK (Fig. 4a, bottom panel) confirms that the “classical” heat shock response is delayed in the *rnhA* mutants. Figure 4b demonstrates a similar delay in the accumulation of *grpE* mRNA in the absence of RNase HI following a “classical” heat shock.

A delayed heat shock response in the absence of RNase HI might be related to problems during transcription of the HSPs genes, such as *dnaK* and *grpE*, and/or to a reduced ability to accumulate σ 32 protein. Figure 5a shows a delay in the accumulation of σ 32 in the *rnhA* mutants following a heat shock. Although *de novo* transcription of *rpoH* is not responsible for σ 32 accumulation during the “classical” heat shock response, the steady-state level of *rpoH* mRNA before the shock ultimately determines both the amount of σ 32 to be stabilized and the amount of *rpoH* mRNA to be translated during the response. However, despite the obvious effect of RNase HI on the accumulation of σ 32 protein, significant

differences in the level of *rpoH* mRNA among the strains are not observed (for example, time 2 min., compare wild-type and *rnhA* mutant in 5a and 5b). Therefore, the delayed response to a “classical” heat shock in the absence of RNase HI seems to be related, at least in part, to a problem in the synthesis (translation of *rpoH*) and/or stabilization of σ_{32} .

*Inactivation of the *rnhA* gene increases thermosensitivity and reduces *rpoH* expression.*

Figure 6a demonstrates the lower survival rates at 51 °C of an *rnhA* mutant. This result shows that a deletion of the *rnhA* gene increases thermosensitivity. Similar results are also obtained when the cells are exposed to 53 °C (not shown). Figure 6b shows that the accumulation of *rpoH* mRNA is slightly reduced (by about 50% relative to wild-type cells) in the *rnhA* mutant as detected by Northern blot analysis. At high temperatures, the *de novo* synthesis of σ_{32} is known to be regulated at the level of *rpoH* transcription, mainly from the P3 promoter (Yura *et al.*, 2000). Regulation at the level of transcription, but from the P1 and P5 promoters, is also seen when the cells are exposed to ethanol (Nagai *et al.*, 1990; Yura *et al.*, 2000), which constitutes a heat-related stress. Figure 7 clearly demonstrates the very weak induction of *rpoH* transcription when *rnhA* null mutants are exposed to ethanol at 10% (a 6 to 10-fold reduction in the level of *rpoH* mRNA in the *rnhA* mutant relative to the wild-type strain, 20 and 30 min. after ethanol exposure).

Despite the fact that the *rpoH* mRNA level is only reduced by about 50% in the absence of RNase HI after 5 min. at 50 °C, Western blot analysis indicates a reduction by more than 10-fold in the accumulation of σ_{32} protein (compare wild-type and *rnhA* mutant, time 5 min., 6a and b). Therefore, problems related to both transcription and translation can explain the greater sensitivity of *rnhA* mutants to lethal heat-related stresses.

*The overproduction of RecG does not correct thermosensitivity and σ_{32} expression in *rnhA* at 51 °C*

RecG is an helicase that performs branch migration of Holliday junction (Lloyd and Sharples, 1993; Whitby and *al.*, 1994), and that is capable of R-loops removal *in vitro* (Vincent *et al.*, 1996). When overproduced, RecG was shown to significantly reduce ColE1 plasmids copies numbers and to resolve R-loops at replication origin of Human mitochondrial DNA (mtDNA) (Fukuoh *et al.*, 1997; Ohsato and *al.*, 1999). Overproduction of RecG in *rnhA* strains would lower the amount of R-loops and might correct thermosensitivity and gene

expression defects. The overexpressed RecG protein in *rnhA* did not correct thermosensitivity and σ^{32} expression at 51 °C (figure 8A, 8B). R-loops inducing replication and recombination events, may not be involved in the inhibition of gene expression in *rnhA*. In fact, RecG deficient strains that express cSDR, however, at a lower rate than in *rnhA* mutant (Hong et al., 1995; Llyod and Buckman, 1991), do not show any defects in thermosensitivity or in σ^{32} expression (figure 8C).

A rho mutation can make an rnhA mutant very sick.

So far, our results indicate that despite the presence of an active topoisomerase I, significant defects in gene expression related to R-loop formation can take place. This may suggest the presence of a multitude of trans-acting factors to regulate R-loop formation. Interestingly, RNase HI overproduction can suppress the lethality of *rho* mutants conferred by plasmids with R-loop replication intermediates (Harinarayanan and Gowrishankar, 2003; J. Lambert and M. Drolet, unpublished results). The *rho* gene encodes the Rho protein, a protein originally identified as a transcription termination factor (Platt, 1994). Rho possesses an helicase activity on RNA-DNA hybrids (Platt, 1994). Figure 8 shows that the *rho112* mutation renders an *rnhA* mutant very sick. This suggests that in addition to RNase HI and topoisomerase I, Rho might be involved in the removal of R-loops that interfere with gene expression.

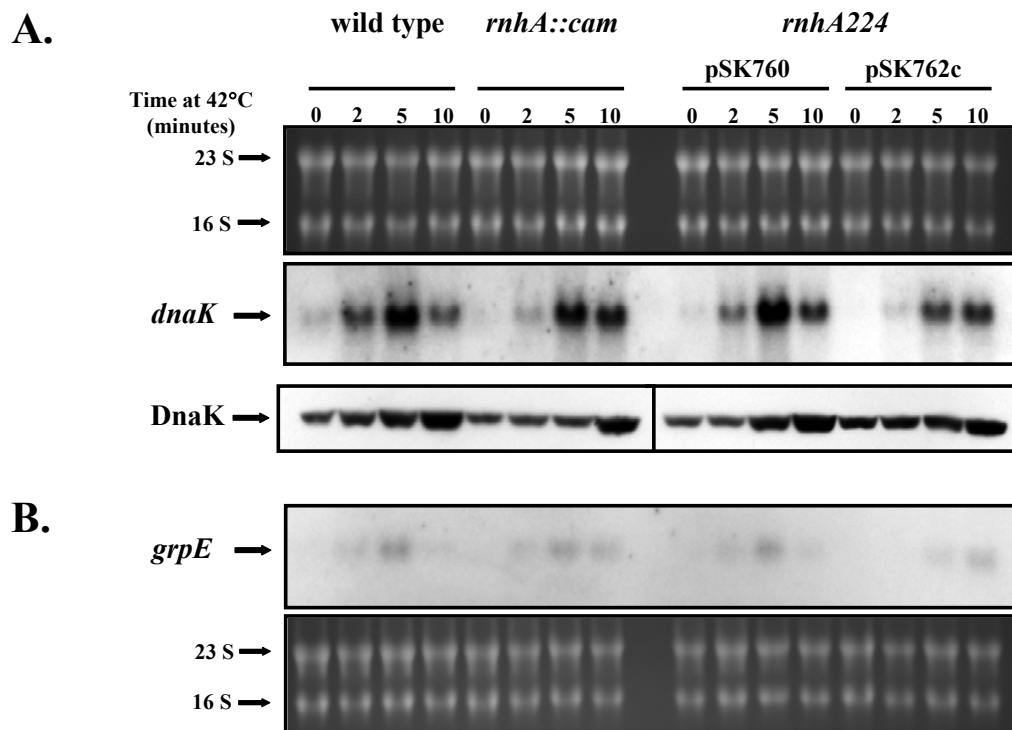


Figure 4. The “classical” heat shock response is delayed in *rnhA* mutants. Cells were grown as described in *Experimental Procedures*. Cell samples were recovered for RNA and proteins at the indicated time following the transfer to 42 °C. For time zero, aliquots of cells were recovered just before the temperature switch. Northern blot analysis was performed as described in *Experimental Procedures* with the oligonucleotide DNAK probe (A, middle panel). The membrane was stripped and re-hybridized with the oligonucleotide GRPE probe (B). In (A, bottom panel) western blot analysis was performed as described in *Experimental Procedures* with DnaK antibodies. Similar results were obtained for the other isogenic pair of strains for both the northern and the western blots (not shown).

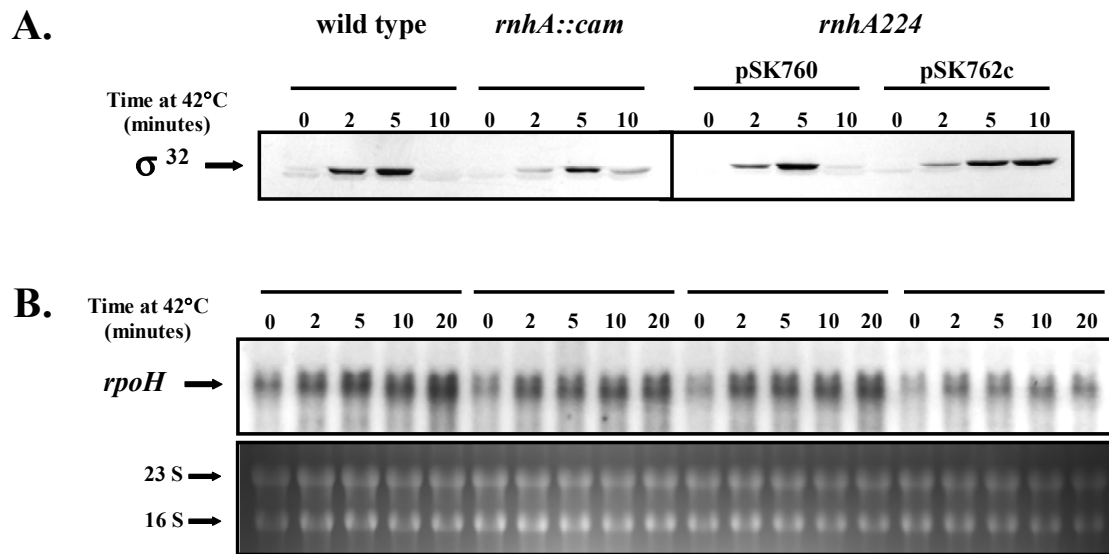
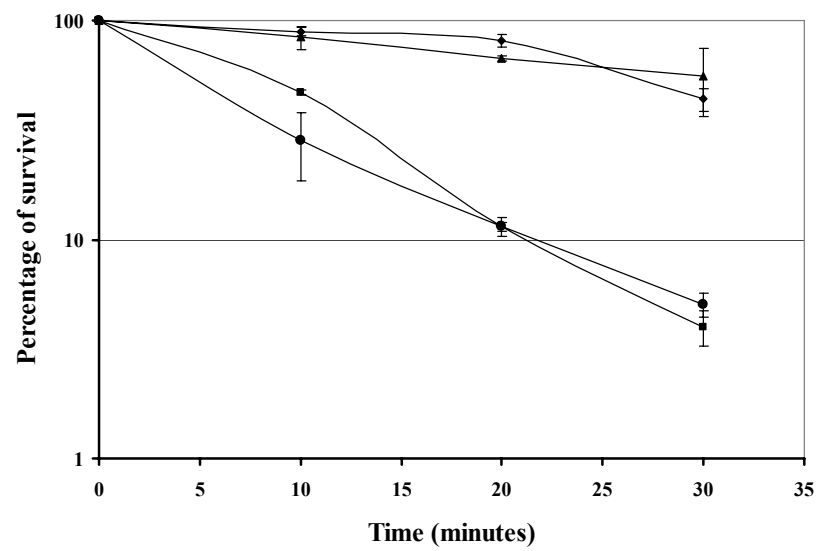


Figure 5. Delayed σ^{32} accumulation in *rnhA* mutants during a “classical” heat shock. Cells were grown as described in Experimental Procedures. Cell samples were recovered for proteins (A) and RNA (B) at the indicated time following the transfer to 42 °C. For time zero, aliquots of cells were recovered just before the temperature switch. In (A) western blot analysis was performed as described in Experimental Procedures with σ^{32} antibodies. In (B) northern blot analysis was performed as described in Experimental Procedures with the oligonucleotide RPOH probe. Similar results were obtained for the other isogenic pair of strains for both the northern and the western blots (not shown).

Fig. 6A



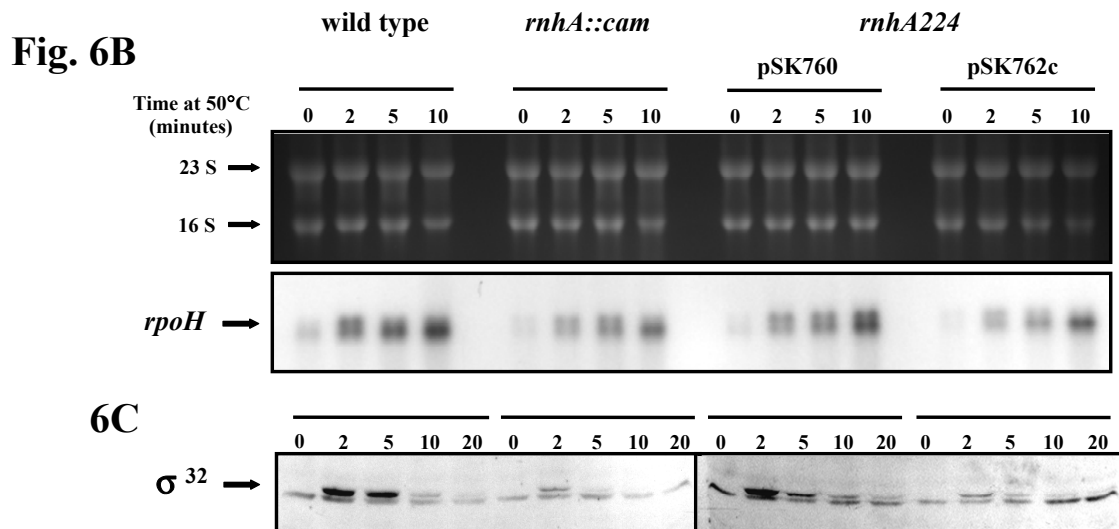


Figure 6. Thermosensitivity of *rnhA* mutants at 50 °C correlates with reduced *rpoH* mRNA and σ^{32} synthesis. Cells were grown as described in Experimental Procedures. A. Survival rates of the strains following a transfer to 50 °C were determined as described in Experimental Procedures. The results of four independent experiments are included here. RFM430, ♦; RFM430 *rnhA::cam*, ■; RFM430 *rnhA224* + pSK760, ▲; RFM430 *rnhA224* + pSK762c, ●. Cell samples were recovered for RNA (B) and proteins (C) at the indicated time following the transfer to 50 °C. For time zero, aliquots of cells were recovered just before the temperature switch. In (B) Northern blot analysis was performed as described in Experimental Procedures with the oligonucleotide RPOH probe. The results shown here are representative of at least three independent experiments with either the oligonucleotide RPOH probe or the random prime-labeled probe. In (C) Western blot analysis was performed as described in Experimental Procedures with σ^{32} antibodies. Similar results were obtained for the other isogenic pair of strains for both the northern and the western blots (not shown).

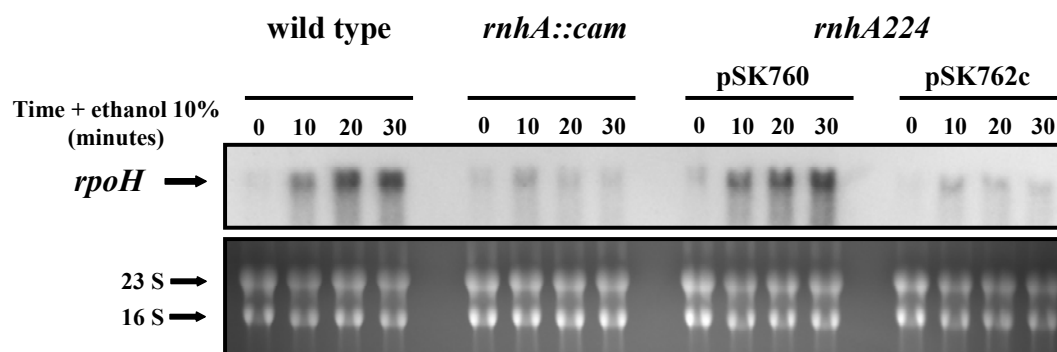


Figure 7. *rnhA* mutants exposed to 10% ethanol fail to induce the synthesis of *rpoH* mRNA. Cells were grown as described in *Experimental Procedures*. Cell samples were recovered for RNA extraction at the indicated time following the addition of ethanol to a final concentration of 10% per volume. For time zero aliquots of cells were recovered just before the addition of ethanol. Northern blot was performed as described in *Experimental Procedures* with a random prime-labeled *rpoH* probe. The results shown here are representative of at least three independent experiments with either the random prime-labeled probe or the oligonucleotide RPOH probe. Similar results were obtained for the other isogenic pair of strains for both the northern and the western blots (not shown).

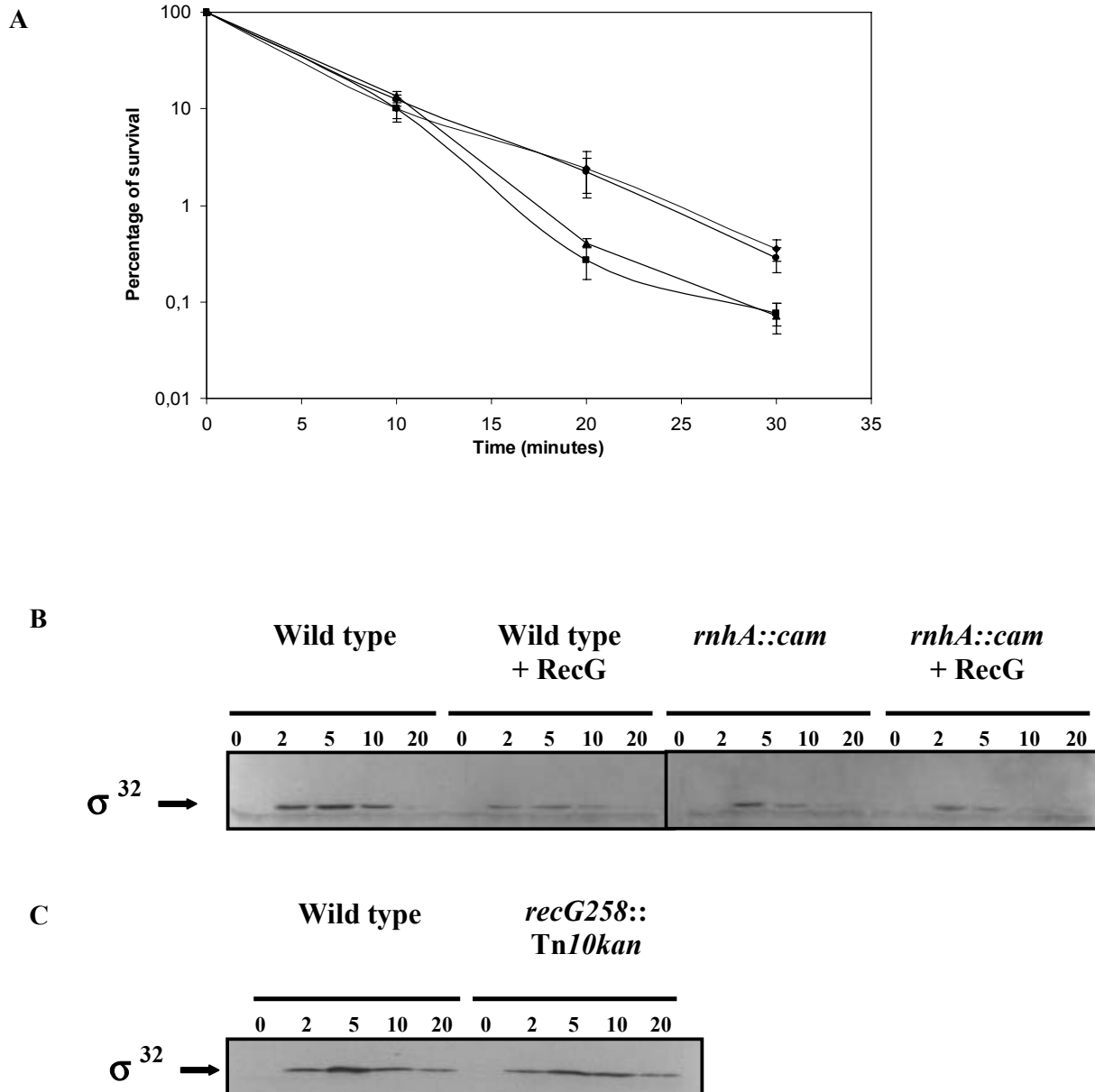


Figure 8. Overproduction of RecG does not correct thermosensitivity and σ^{32} expression problems at 51 °C in *rnhA*, and the inactivation of *recG* shows no alteration in σ^{32} expression at 51 °C. The Survival rates of the strains following a transfer to 51 °C (A) and Western blot analysis was performed with σ^{32} antibodies (B and C), were done exactly as in figure 6. (A) The results shown here represent three independent experiments. All strains in (A) and (B) carries pGB2recG producing RecG under IPTG (1mM) (see experimental procedures). RFM430 + pGBrecG, ◆; RFM430 + pGBrecG plus IPTG, ●, RFM430 *rnhA::cam* + pGBrecG, ■; RFM430 *rnhA::cam* + pGBrecG plus IPTG, ▲. (C) Wild type is AB1157 *recG*⁺ and *recG258::Tn10Kan* is N2731 as listed in table 1.

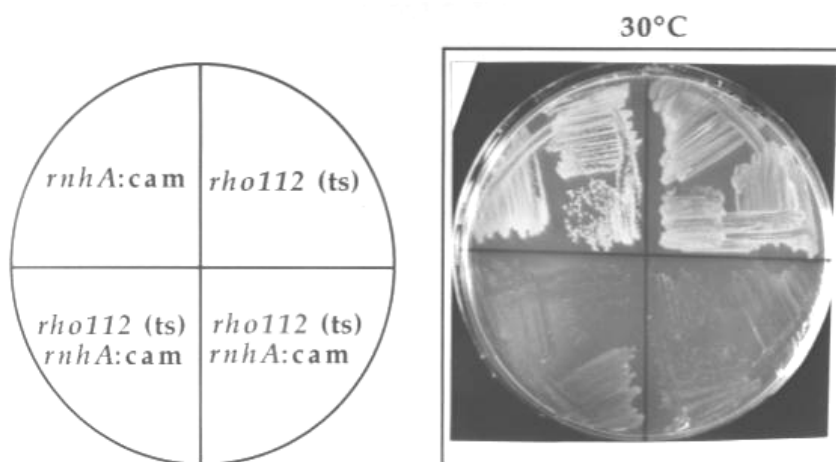


Figure 9. *rho112(ts)* renders an *rnhA* mutant very sick at 30 °C. Different cells used in this experiment were plated on LB agar supplemented with tryptophan (0,5%) from LB glycerol (0,8%) -80 °C stocks, and incubated at 30 °C for 24 hours. *rnhA* mutant strains are listed in table 1.

5. DISCUSSION

Until now, the best evidence for the involvement of R-loops and RNase HI in gene expression has been obtained by studying *topA* null mutants. The work presented here provides additional evidence to this fact. In *topA* null mutants, defects in rRNA synthesis (*rrn* operons) related to R-loops and transcription elongation have been demonstrated (Hraiky *et al.*, 2000). Moreover, R-loop formation both *in vitro* and *in vivo* during transcription of an *rrnB* fragment on plasmids in the absence of DNA topoisomerase I has been reported (Phoenix *et al.*, 1997; Massé *et al.*, 1997). More recently, evidence has been provided that R-loops can affect the expression of genes transcribed into mRNA, such as those encoding *crp* and *lac* (Baaklini *et al.*, 2004), as demonstrated here for *rnhA* mutants. As shown by RecG overproduction, possible interferences of cSDR and SOS activities with transcription events, may not be involved in inhibition of gene expression in *rnha*. Moreover, the fact that double *nusB topA* null mutants are non-viable and that double *rnhA nusB* mutants are very sick further supports the involvement of RNase HI in gene expression (Drolet *et al.*, 2003). *nus* genes code for proteins involved in transcription antitermination (Friedman and Court, 1995). Our finding that a double *rho rnha* mutant is very sick and the fact that double *nusG rnha* mutants (Harinarayanan Gowrishankar, 2003) are unviable, also support the role of *rnha* in gene expression. All these studies reveal that a multitude of factors, such as topoisomerase I, RNase HI, Rho and NusG, might be involved in R-loop removal and/or prevention, to allow gene expression.

In this paper, we have also shown that RNase HI is required for cells to efficiently respond to heat-related stresses. However, our results by no way indicate that this enzyme is directly involved in the heat shock response, as more severe phenotypes, such as lethality at 42°C, should have been observed (Yura *et al.*, 2000). Rather, as shown by the growth curves and the results of β -galactosidase and *crp* expression, our data demonstrate that RNase HI can facilitate the expression of a multitude of genes, whether or not they are related to stresses. However, this function would be mostly revealed when substantial and rapid gene expression is required for stress resistance. If at one step or another the concentration of a key element of the response is too low, stress resistance would be affected. The work presented here points to σ_{32} as the key element for which the accumulation is defective in the *rnha* mutant. According to our results, σ_{32} accumulation seems to be affected at several steps, including *rpoH* transcription, translation and possibly σ_{32} stability. σ_{32} turnover is regulated by several

proteases, including FtsH, HslVU, ClpAP and Lon (Yura *et al.*, 2000), the level of which could well be altered in *rnhA* mutants.

Much less is known about the mechanism(s) of R-loop formation and their effects on gene expression. Based on the observation that transcription-translation coupling can inhibit R-loop formation (Massé and Drolet, 1999a, Broccoli *et al.*, 2004), it has been proposed that its initiation takes place behind the moving RNA polymerase, where negative supercoiling is sufficiently high to allow the re-annealing of the nascent RNA with the template strand (Massé and Drolet, 1999a, Broccoli *et al.*, 2004). From this model, it has been proposed that R-loop formation can be favored under stressful conditions, where translation is transiently uncoupled from transcription (Massé *et al.*, 1999b). Once formed, R-loops are proposed to act as roadblocks for the next transcribing RNA polymerase (Hraiky *et al.*, 2000; Drolet *et al.*, 2003; Baaklini *et al.*, 2004; Fig. 9, 2a). The positive effect of RNase HI on *in vitro* transcription of negatively supercoiled templates has been demonstrated (Massé *et al.*, 1999a; Gopal *et al.*, 1999; Drolet *et al.*, 2003). It has also been shown that RNA polymerases with extended RNA-DNA hybrids are more prone to termination (Tomizawa and Masukata, 1987; Kireeva *et al.*, 2000). For the moment, we cannot exclude the possibility that R-loop formation originates from the transcription bubble and that it is therefore directly linked to the mechanism of transcription. More experiments are definitively required to elucidate the mechanism(s) by which R-loops are formed and inhibit transcription. In addition, we also have to consider the possibility that R-loops not only block the progression of RNA polymerases, but also impede the progression of ribosomes. In such a case, ribosomes might be titrated out following massive R-loop formation thus inhibiting translation (Fig. 9, 2b) and a specific system, such as the one involving tmRNA (Withey and Friedman, 2003), might be required to rescue them. Interestingly, apart from inhibiting transcription elongation which is by far the most frequent genetic event, and possibly translation, R-loops were recently shown to be associated with one form of transcription-induced hyperrecombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Huertas and Aguilera, 2003). In this case, a link between R-loops and inhibition of transcription elongation was also demonstrated. Recent evidence also points to a role for R-loops in immunoglobulin class switch recombination (Yu *et al.*, 2003). In conclusion, the involvement of RNase H in R-loop removal is certainly an important function that could ultimately affect a multitude of DNA transactions.

6. EXPERIMENTAL PROCEDURES

Escherichia coli strains

Escherichia coli strains used in this study are listed and described in Table 1. PH379 (RFM430 *rnhA::cam*) was constructed by transduction with phage P1*vir* grown on MIC1020 and by selecting for resistance to chloramphenicol (15 µg/ml). PCR was used to confirm the presence of only the *rnhA::cam* allele on the chromosome.

Plasmids

pSK760 and pSK762c are pBR322 derivatives that carry the wild-type or a mutated and inactive version of the *rnhA* gene (Drolet *et al.*, 1995). pGB2*recG*lacI (*spc*^R) is a gift from Benedict Michelle.

Media and growth conditions

The cells were grown in LB medium (0.5% NaCl). When the cells carry either pSK760 or pSK762c, LB medium was supplemented with ampicillin at 50 µg/ml. Overnight cultures grown at 37°C, unless otherwise indicated, were diluted to an OD₆₀₀ of 0.02 in fresh LB medium and the cells were grown at the same temperature to an OD₆₀₀ of about 0.4. For the heat shock, the cells were then transferred to 28°C for 30 minutes before the switch to the indicated temperature in the figure legends. Normally, to study the heat shock response in *E. coli*, the cells are grown at temperatures close to 30°C before the shock. However, in our case, the cells were not exposed for prolonged time to 28°C, because the growth of *rnhA* mutants has been reported to be perturbed by low temperatures and we wanted to avoid the possible accumulation of faster growing revertants (Torrey *et al.*, 1984). For the ethanol stress, once the OD₆₀₀ reached 0.4 at 37°C, ethanol was added to 10% (v/v).

Survival rates

After the heat shock as described above, the relative rates of survival were determined by serial dilutions and plating on LB. The plates were incubated at 37 °C for 24 hours before counting the colonies. One hundred percent survival corresponds to the number of viable cells just before the heat shock.

β-galactosidase assays

β-galactosidase activity was assayed as described in Miller (1992) with the modifications described in Baaklini *et al.* (2004).

Northern blot analysis

RNA extraction was performed using the TRIzol reagent (Invitrogen) as described previously (Wassarman and Storz, 2000). Northern blots of RNA samples (25 µg) separated by electrophoresis in 1.2 % agarose gels containing formaldehyde were performed as described (Hraiky *et al.*, 2000). RPOH oligonucleotide, d(CTCAATCGATATCTTCTGGCGCTTCAGTGGTAGCAACAACACTGTGCCAGAGC), was used to detect *rpoH* mRNA, DNAK oligonucleotide, d(CCAATTATTTTACCCATCTAAACGTCTCCACTATATATTCGGTCATCATGTGG), to detect *dnaK* mRNA, GRPE oligonucleotide, d(CGTTTTCTGTTCTTTACTACTCATGAATTTCTCCGCGTTTTTTTCGCATTCATCTC G), to detect *grpE* mRNA and CRP2 (Baaklini *et al.*, 2004) to detect *crp* mRNA initiated at both P1 and P2 promoters.. For *rpoH*, some Northern blots were probed with a random prime-labeled DNA fragment obtained by PCR with d(GCTTTAGCCCCAGTTGGC) and d(CGCTCAGCGGAAACGCCG) oligonucleotides. Identical results were obtained with either this probe or the oligonucleotide RPOH probe. The Northern blots shown in this work are representative of the results of at least three independent experiments. Quantification of the bands on the films was performed by using the ImagQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

Western blot analysis

The equivalent of 200 µl of cell culture at an OD₆₀₀ of 0.7 was used for Western blot analysis. The cell pellets were lysed by boiling in sodium dodecyl sulphate (SDS). The proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis at 7.5 % for DnaK and 12 % for σ32. Western blots were performed as described (Sambrook *et al.*, 1989) by using nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, Amersham Biosciences). After the transfer, the membranes were stained with Ponceau S (Fisher Scientific) to confirm that similar amounts of proteins were loaded in each lane. Antibodies from Stessgen Biotechnologies were used to detect DnaK, whereas antibodies from NeoClone Biotechnology International were used to detect σ32. The ECL detection Kit (Amersham Biosciences) was used to reveal the specific proteins. The Western blots shown in this work are representative of the results of at least three independent experiments. Quantification of the bands on the films was performed by using the ImagQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

7. ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sonia Broccoli and Bob Crouch for critical reading of the manuscript and many helpful discussions. This work was supported by grants FNR 12667 from the CIHR (to M.D.). M.D. is a chercheur-boursier senior from the FRSQ. C.F. holds a studentship award from the CIHR.

Table 1. Liste of *E.coli* strains used in this study

Strains	Genotype	References
RFM430	<i>Rpsl, galK2, ΔtrpE</i>	Drolet et al. (1995)
MD317	RFM430 <i>rnhA224, zag 3198::Tn10kan</i>	Drolet et al. (1995)
MIC1020	AB1157 <i>rnhA::cam</i>	Itaya and Crouch
PH379	RFM430 <i>rnhA::cam</i>	This work
N2731	AB1157 <i>recG258:: Tn10Kan</i>	Llyod and Buckman (1991)
AB1157	<i>recG</i> ⁺	Llyod and Buckman (1991)

8. REFERENCES

- Baaklini, I., Hraiky, C., Rallu, F., Tse-Dinh, Y.-C. and Drolet, M. (2004) RNase HI is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**, 198-191
- Broccoli, S., Rallu, F., Sanscartier, P., Cerritelli, S.M., Crouch, R.J. and Drolet, M. (2004) Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced supercoiling and associated R-loop formation. *Mol Microbiol.* **52**, 1769-1779.
- Cheng, B., Rui, S., Ji, C., Gong, V.W., Van Dyk, T.K., Drolet, M. and Tse-Dinh, Y.C. (2003) RNase H overproduction allows the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I. *FEMS Microbiol Lett*, **221**, 237-242.
- Crouch, R.J. and Dirksen, M.-L. (1982) in *Nucleases* (Linn, S.M. and Roberts, R.J., Eds.) pp 211-241, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F. and Crouch, R.J. (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3526-3530.
- Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Massé, E. and Baaklini, I. (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci*, **8**, D210-221.
- Friedman, D.I. and Court, D.L. (1995) Transcription antitermination: the lambda paradigm updated. *Mol Microbiol*, **18**, 191-200.
- Fukuoh A, Iwasaki H, Ishioka K, Shinagawa H (1997) ATP-dependent resolution of R-loops at the ColE1 replication origin by *Escherichia coli* RecG protein, a Holliday junction-specific helicase. *EMBO J* **16**, 203-9.
- Gopal, V., Brieba, L.G., Guajardo, R., McAllister, W.T. and Sousa, R. (1999) Characterization of structural features important for T7 RNAP elongation complex stability reveals competing complex conformations and a role for the non-template strand in RNA displacement. *J Mol Biol*, **290**, 411-431.
- Harinarayanan, R. and Gowrishankar, J. (2003) Host factor titration by chromosomal R-loops as a mechanism for runaway plasmid replication in transcription termination-defective mutants of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **332**, 31-46.
- Hong X, Cadwell GW, Kogoma T (1995) *Escherichia coli* RecG and RecA proteins in R-loop formation. *EMBO J* **14**, 2385-92.
- Hostomsky, Z., Hostomska, Z. and Matthews, D.A. (1993) in *Nucleases* (Linn, S.M. and Roberts, R.J., Eds.) 2nd ed., pp 341-376, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Hraiky, C., Raymond, M.A. and Drolet, M. (2000) RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of

- DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **275**, 11257-11263.
- Huertas, P and Aguilera, A. (2003). Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell*, **12**, 711-721.
- Itaya, M. and Crouch, R.J. (1991a) A combination of RNase H (*rnh*) and *recBCD* or *sbcB* mutations in *Escherichia coli* K12 adversely affects growth. *Mol Gen Genet*, **227**, 424-432.
- Itaya, M. and Crouch, R.J. (1991b) Correlation of activity with phenotypes of *Escherichia coli* partial function mutants of *rnh*, encoding RNase H. *Mol Gen Genet*. **227**, 433-437.
- Kireeva, M.L., Komissarova, N. and Kashlev M. (2000) Overextended RNA:DNA hybrid as a negative regulator of RNA polymerase II processivity. *J Mol Biol*, **299**, 325-335.
- Kogoma, T., Hong, X., Cadwell, G.W., Barnard, K.G. and Asai, T. (1993) Requirement of homologous recombination functions for viability of the *Escherichia coli* cell that lacks RNase HI and exonuclease V activities. *Biochimie*, **75**, 89-99.
- Kogoma, T. (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 212-238.
- Kogoma, T. and Foster, P.L. (1998) Physiological functions of *E. coli* RNase HI. In: *Ribonucleases H* (Crouch, R.J. and Toulmé, J.J. Eds.), pp. 39-66. Paris: INSERM.
- Lloyd RG, Buckman C (1991) Genetic analysis of the *recG* locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *J Bacteriol* **173**, 1004-11.
- Lloyd RG, Sharples GJ (1993) Dissociation of synthetic Holliday junctions by *E. coli* RecG protein. *EMBO J* **12**, 17-22.
- Massé, E., Phoenix, P. and Drolet, M. (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **272**, 12816-12823.
- Massé, E. and Drolet, M. (1999a) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*, **274**, 16659-16664.
- Massé, E. and Drolet, M. (1999b) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli* *topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol*, **294**, 321-332.
- Miller, J. H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Morita, M.T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Kyogoku, Y. Yanagi, H. and Yura, T. (1999) Translational induction of heat shock transcription factor σ^{32} : evidence for a built-in thermosensor. *Genes and Dev*, **13**, 655-665.

Nagai, H., Yano, R., Erickson, J.W. and Yura, T. (1990) Transcriptional regulation of the heat shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: Involvement of a novel catabolite sensitive promoter.

Ohtani, N., Haruki, M., Morikawa, M., Crouch, R.J., Itaya, M. and Kanaya, S. (1999) Identification of the genes encoding Mn²⁺-dependent RNase HII and Mg²⁺-dependent RNase HIII from *Bacillus subtilis*: Classification of RNases H into three families. *Biochemistry*, **38**, 605-618.

Ohsato T, Muta T, Fukuoh A, Shinagawa H, Hamasaki N, Kang D (1999) R-Loop in the replication origin of human mitochondrial DNA is resolved by RecG, a Holliday junction-specific helicase. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 1-5.

Phoenix, P., Raymond, M.A., Massé, E. and Drolet, M. (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J Biol Chem*, **272**, 1473-1479.

Platt, T. (1994) Rho and RNA: models for recognition and response. *Mol Microbiol*, **11**, 983-990.

Qi, H., Menzel, R. and Tse-Dinh, Y.C. (1996) Effect of the deletion of the sigma 32-dependent promoter (P1) of the *Escherichia coli* topoisomerase I gene on thermotolerance. *Mol Microbiol*, **21**, 703-711.

Tomizawa, J. and Masukata, H. (1987) Factor-independent termination of transcription in a stretch of deoxyadenosine residues in the template DNA. *Cell*, **51**, 623-630.

Torrey TA, Atlung T, Kogoma T. (1984) *dnaA* suppressor (*dasF*) mutants of *Escherichia coli* are stable DNA replication (*sdrA/rnh*) mutants. *Mol Gen Genet*, **196**, 350-355.

Wang, J.C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 430-440.

Wassarman, K.M. and Storz, G. (2000) 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell*, **101**, 613-623.

Whitby MC, Vincent SD, Lloyd RG (1994) Branch migration of Holliday junctions: identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *EMBO J* **13**, 5220-8.

Withey JH, Friedman DI. (2003) A salvage pathway for protein structures: tmRNA and translation. *Annu Rev Microbiol*, **57**, 101-123.

Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.L., Wilson, T.E. and Lieber, M.R. (2003) R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol*, **4**, 442-451.

Yura, T., Kanemori, M. and Morita, M.T. (2000) The heat shock response: regulation and function. In: *Bacterial stress responses* (Storz, G. and Hengge-Aronis, R. eds.) pp 3-18, ASM Press, Washington, DC.

IV. DISCUSSION

1. Les ARNm incomplets inhibent la synthèse protéique en absence de topoisomérase I

À température non permissive de 28 °C, la formation de R-loops pendant la transcription de l'opéron *rrnB* génère des produits d'ARN ribosomaux (ARNr) prématurés et stables dans les souches *topA gyrB*(Ts) (Hraiky et al., 2000). L'accumulation d'ARNr prématurés dans ces souches se traduit par un ratio 23S/16S d'ARNr inférieur à 1. Les ARNr en question ont une taille approximative de 180 nucléotides et contiennent la séquence « leader », une région qui se trouve entre le promoteur P2 et le premier nucléotide du 16S de l'opéron *rrnB* (figure 1). Les ribosomes sont des composants essentiels de la cellule et leur biosynthèse est minutieusement régulée en fonction des besoins et selon les conditions du milieu de croissance (Gourse et al., 1996; Paul et al., 2004; Wagner, 1994). La biogénèse des ribosomes débute par la synthèse et la maturation des ARNr, avant d'être complétée par l'association des ARNr avec des protéines (Kaczanovska et Rydén-Aulin, 2007, figure 2). Diverses protéines et facteurs sont impliqués dans ce processus ce qui rend la tâche très complexe. Chez *Escherichia coli*, il existe sept opérons ribosomaux encodant les ARNr : *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* et *rrnH*. Un long transcrit de chaque opéron contenant l'ensemble des ARNr 16S, 23S, 5S et l'ARN de transfert (ARNt) est synthétisé puis mûri pendant la transcription par une série de clivages. L'adoption de structures secondaires par l'ARNr à sa sortie de l'ARN polymérase est cruciale pour l'étape de maturation (figure 2). Dans la petite région sur l'ARN entre la fin du « leader » et le début du 16S, on trouve le site de clivage interne de la RNase III. Habituellement, ce site de clivage permet à la RNase III de séparer le « leader » du 16S.

On attribue deux fonctions majeures à la séquence « leader ». La première est son rôle dans l'antiterminaison de la transcription (Condon et al., 1995) et la deuxième est son rôle dans la maturation du 16S (Besançon et Wagner, 1999). La région leader qui est conservée pour les sept opérons ribosomaux, est composée de séquences d'antiterminaisons « *nut* » et de séquences dites « *t_L* » (figure 1). Les séquences *nut* contiennent les régions *boxA*, *boxB* et *boxC* qui sont importantes lors de l'assemblage sur l'ARN polymérase du complexe d'antiterminaison. Ce complexe permet à l'ARN polymérase de transcrire à travers des terminateurs Rho-dépendants (Li et al., 1984, Berg et al., 1989). Certains facteurs comme par exemple, NusA, NusB, NusG, NusE (protéines ribosomales S10), NusG ainsi que la protéine

ribosomale S4, sont essentiels au processus d'antiterminaison (Vogel et Jensen, 1995; Vogel et Jensen 1997; Zellars et Squires, 1999; Torres et *al.*, 2001; Torres et *al.*, 2004; Bubunenko et *al.*, 2007). Une mutation dans la région *boxA* conduit à une diminution de 20 à 25 % de la quantité de 16S et de 23S, et une mutation dans la région intergénique entre *boxA* et *boxB* conduit aussi à une diminution de 15% de la production de 50S (Heinrich et *al.*, 1995; Pfeiffer et Hartmann, 1997). Parmi les trois régions *boxA-boxB-boxC*, seule *boxA* est essentielle à l'antiterminaison Rho-dépendante. Le 30S et le 50S sont deux sous-unités ribosomales qui s'associent pour former un ribosome 70S. Le 30S est formé par le 16S et son association à des protéines et le 50S est formé du 23 S et de son association avec des protéines. Située proche de 16S, la séquence « t_L » du « leader » interagit avec le 16S de façon transitoire et participe à l'adoption de sa structure secondaire (Pardon et Wagner, 1995; Besançon et Wagner, 1999). Des mutations ponctuelles dans la région « t_L » ont pour conséquences un retard dans la croissance et une sensibilité aux basses températures. Ce phénotype est causé par un défaut dans la structure du 30S, qui rend cette sous unité ribosomale fonctionnellement défectueuse (Balzer et Wagner, 1998; Theissen et Wagner, 1993). Comme le site de clivage de la RNase III se trouve très proche du 16S, des mutations ou des changements qui affectent ces séquences sur l'ADN influencent le clivage par la RNase III et sont à l'origine d'un mauvais repliement du 16S (Schaferkordt et Wagner, 2001).

En absence de topoisomérase I, des R-loops peuvent se former au début du 16S de l'opéron *rrnB*, sur un fragment d'ADN compris entre les deux sites de restriction de l'enzyme HindIII (Massé et *al.*, 1997). La formation de R-loops dans la région du « leader » ou celle du 16S pourrait avoir de sérieux effets sur la synthèse des ARNr. Les R-loops pourraient en effet constituer un obstacle à la progression des ARN polymérases et interférer avec le processus d'antiterminaison ou le clivage par la RNase III. Un arrêt de la transcription ou une terminaison prématurée de la transcription pourraient aussi bien qu'une absence de clivage par la RNase III causer des défauts dans la maturation des ARNr. Comme le court transcrit de 180 nucléotides qui s'accumule dans la souche *topA gyrB*(Ts) contient la séquence « leader » ainsi que les premières séquences du 16S, ceci indique l'absence de clivage par la RNase III (Hraiky et *al.*, 2000). Il a été montré que des défauts de synthèse ou une maturation inappropriée de l'ARNr peuvent conduire à l'accumulation de précurseurs d'ARNr (Sagter-Jager et *al.*, 2007). Chez la levure, il est aussi démontré que l'activité d'élongation de l'ARN polymérase est directement reliée au processus de maturation des ARNr et à l'assemblage des sous-unités ribosomales (Schneider et *al.*, 2007). La formation de R-loops dans la région du

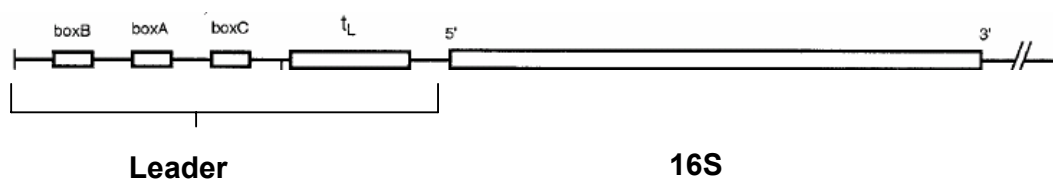


Figure 1 : La région « Leader » l'ARN ribosomal. La région « leader » comprise entre le promoteur P2 et le début du 16S, contient les séquences boxA, boxB, boxC et les séquences t_L .

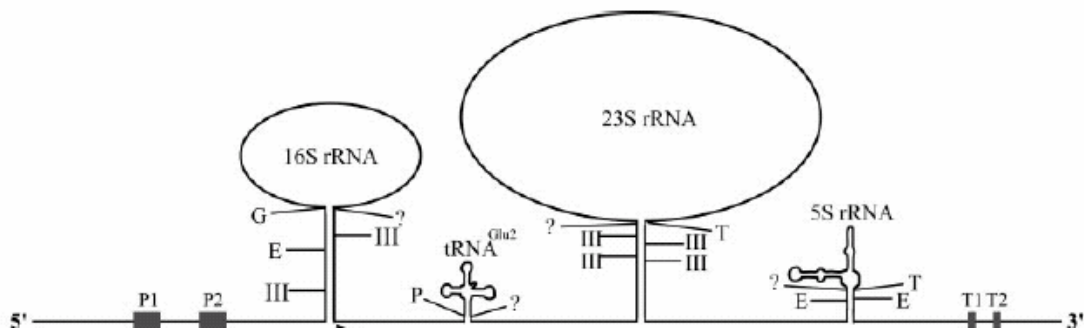


Figure 2 : Maturation des ARNr de l'opéron *rrnB* (Kaczanovska et Rydén-Aulin, 2007).

Le premier clivage est réalisé par l'endoribonucléase III (RNase III) qui permet la séparation entre le 16S et l'ARNt. La RNase III reconnaît la tige double brin ARN de la structure tige-boucle de 16S et clive au niveau de sa séquence spécifique (Bram et *al.*, 1980; Liiv et Remme, 2004; Young et Steitz, 1978). L'action de la RNase III génère tout d'abord un 17S, le précurseur du 16S, qui possède en 5' et 3' des séquences supplémentaires par rapport au 16S. Les séquences en 5' sont maturées par la RNase E et G (Li et *al.*, 1999; Wachi et *al.*, 1999). L'enzyme qui procède à la maturation de l'extrémité 3' n'a pas encore été identifiée. La RNase E est une endoribonucléase qui préfère les extrémités 5' monophosphatées (Mackie, 1998; Mackie 2000). La RNase G est une endoribonucléase qui a une fonction homologue à celle de la RNase E (Li et *al.*, 1999; Wachi et *al.*, 1999), mais ne peut totalement se substituer pour la RNase E (Lee et *al.*, 2002; Ow et *al.*, 2003). Une fois synthétisée, la maturation du 23S est strictement dépendante de la RNase III qui clive l'ARN double brin au niveau de la tige dans la structure tige-boucle. L'exoribonucléase RNase T enlève les extrémités 3' de la tige du 23S (Li et *al.*, 1999) et une autre enzyme encore inconnue dégrade l'autre extrémité 5'. La RNase T est une exoribonucléase qui reconnaît en 5' une région spécifique de 4 nucléotides sur un ARN simple brin (Zuo et Deutscher, 2002 a et b). La maturation du 5S commence par un clivage grâce à la RNase P qui génère un 9S, suivi par l'action de la RNase E aux extrémités 5' et 3' puis par celle de la RNase T à l'extrémité 3' (Li et Deutscher, 1995). Une enzyme encore non identifiée termine le travail de maturation en 5' du 5S. La RNase P est une endonuclease qui reconnaît une région d'ARN simple brin en 5', proche d'une structure tige-boucle (Altman, 2007).

« leader » pourrait donc avoir des effets négatifs sur la synthèse et la maturation des ARNr ce qui pourrait également entraîner l'assemblage de ribosomes fonctionnellement défectueux. L'assemblage de ribosomes inactifs pourrait causer l'inhibition de la traduction et mener à l'inhibition transitoire de la croissance dans la souche *topA gyrB*(Ts) (Baaklini et al., 2004).

Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué des essais de traductions *in vitro* avec des extraits S30 de nos cellules. Un extrait S30 est une solution qui contient des ribosomes et les facteurs nécessaires à leur fonctionnement (Zubay, 1973). L'ARN du phage MS2 et un oligonucléotide constitué d'une suite d'uracil (PolyU), ont été utilisés comme ARN dans ces expériences de traduction *in vitro*. L'ARN du phage MS2 possède un site d'initiation de la traduction et permet de vérifier la capacité des ribosomes à initier la traduction. Le PolyU est une longue chaîne d'uracile sans site d'initiation de la traduction et permet de tester la capacité d'élongation des ribosomes. La faculté des extraits S30 à traduire ces deux ARN est mesurée à 28 °C en fonction du temps par la formation de chaînes d'acides aminés radioactifs. Les résultats de nos essais montrent que la quantité moyenne de chaînes d'acides aminés synthétisés à 28 °C est sensiblement pareille pour les extraits S30 obtenus en absence ou en présence de topoisomérase I (tableau I). Il n'y a donc aucun défaut dans l'activité des ribosomes de la souche *topA gyrB*(Ts), ni pour l'initiation, ni pour l'élongation de la traduction.

L'inhibition de la traduction dans le mutant *topA gyrB*(Ts) à 28 °C devrait donc s'expliquer autrement que par l'inactivation des ribosomes. Nous avons déjà démontré qu'en absence de topoisomérase I, la synthèse de plusieurs ARN messagers (ARNm) est négativement affectée (Baaklini et al., 2004). Des ARNm incomplets en proportion plus importante que des ARNm de pleines longueurs s'accumulent dans les souches *topA gyrB*(Ts) à 28 °C. Ces ARNm incomplets qui s'accumulent représentent des produits d'ARNm qui possèdent encore leur extrémité 5' et donc leur site d'initiation de la traduction. Si ces nombreux ARNm incomplets sont traductibles, ils pourraient être à l'origine de l'inhibition de la traduction. Réellement, le manque d'ARNm de pleine longueur et l'excès d'ARNm incomplets auraient pour conséquence la synthèse d'un nombre insuffisant de protéines complètes et la synthèse de nombreuses protéines tronquées. Une telle modification dans le profil de protéines serait désastreuse pour la cellule car les protéines tronquées étant en principe non fonctionnelles, le nombre insuffisant de protéines complètes et fonctionnelles présent ne serait pas en mesure de supporter la croissance. Une façon directe d'examiner la traductibilité de ces ARNm

incomplets est de voir s'ils sont associés aux ribosomes de la cellule. Les ribosomes totaux de nos cellules ont donc été fractionnés et les ARNm présents dans ces fractions ont été extraits (Article 1, figure et 2). Les différentes fractions de ribosomes que l'on retrouve dans une cellule sont : les 30S, les 50S, les monosomes et les polysomes. Un monosome représente un seul ribosome (70S) associé à un ARNm. Les polysomes représentent plusieurs ribosomes associés à un même ARNm comme par exemple, un disome (deux ribosomes) ou un trisome (trois ribosomes). L'ARNm de *yhdG* et de *fis* de l'opéron *yhdG-fis* ainsi que l'ARNm *crp* sont les ARNm incomplets que nous avons ciblés dans cette expérience. Nous avons montré auparavant que des produits d'ARN incomplets s'accumulaient pour ces deux gènes en absence de topoisomérase I (Baaklini et *al.*, 2004). Les profils de ribosomes obtenus en absence de topoisomérase I montrent un pic très élevé de monosomes (Article 1, figure 2 et 3). Les ribosomes dans la souche *topA gyrB*(Ts) à 28 °C sont en effet distribués en monosomes et presque pas en polysomes. Dans les souches témoins *gyrB*(Ts) et *topA gyrB*(Ts) qui surproduisent la RNase HI, on constate que les ribosomes sont distribués en monosomes et en polysomes. De façon générale, les ARNm associés aux ribosomes pour chacune des souches sont identiques en qualité et quantité à ceux que l'on retrouve habituellement dans chaque cellule. Les ARNm courts de *crp* dans la souche *topA gyrB*(Ts) sont associés aux monosomes et les ARN pleine longueur de *crp* présents dans les souches *gyrB*(Ts) et *topA gyrB*(Ts) qui surproduit la RNase HI, sont distribués autant sur les monosomes que sur les polysomes. Les ARNm de *fis* qui ne sont pas bien exprimés dans la souche *topA gyrB*(Ts) à 28 °C ne sont donc pas associés aux monosomes dans cette cellule. Puisqu'il est bien exprimé dans les souches *gyrB*(Ts) et *topA gyrB*(Ts) qui surproduisent la RNase HI, *fis* se retrouve associé aux monosomes et aux polysomes présents dans ces cellules. Nous pouvons donc affirmer que les ARNm incomplets qui s'accumulent dans le mutant *topA gyrB*(Ts) sont bien fonctionnels. Nous constatons également que le profil de ribosomes dans chaque cellule corrèle parfaitement avec la taille et l'abondance des ARN produits. Ceci s'explique par le fait que le nombre de ribosomes associés à un même ARNm dépend de la longueur de cet ARN. Plus l'ARN est long, plus il peut contenir de ribosomes et inversement lorsque l'ARN est court. C'est pour cette raison que dans la souche *topA gyrB*(Ts) qui produit des ARNm incomplets, on aperçoit surtout des monosomes et très peu de polysomes. Puisque les profils des ribosomes sont faits à partir de ribosomes totaux, ils reflètent assez bien toute l'activité traductionnelle de la cellule. Le phénomène de production d'ARNm incomplets s'appliquerait donc à tous les ARNm synthétisés dans la souche *topA gyrB*(Ts).

Comme les ARN incomplets sont traductibles, ils devaient alors être en mesure de produire des protéines tronquées dans le mutant *topA gyrB(Ts)* 28 °C. Alors que l'ensemble des protéines produites dans une cellule sont stables, les protéines anormales sont instables car elles sont très vite dégradées (Goldberg, 1972; Gottesman, 1996). Parmi les protéines anormales et instables, on distingue celles dont la conformation est inexacte, les protéines avec une suite d'acides aminés incorrecte et les protéines tronquées (Goldberg, 1972; Gottesman, 1989). Une cinétique de synthèse protéique *in vivo* tient compte de l'accumulation et de la dégradation des protéines. Dans ce type d'expérience, on détecte donc uniquement les protéines qui peuvent s'accumuler. Ceci veut dire que des protéines tronquées devraient être représentées par une diminution de l'intensité de leur signal ou une absence de bandes visibles après migration sur gel. Les migrations sur gel d'acrylamide réalisés à partir des cinétiques de synthèse protéique dans le mutant *topA gyrB(Ts)* à 28 °C ne montrent pas l'absence de bandes particulières (Article 1, figure 4). En général, le signal radioactif sur gel pour la souche *topA gyrB(Ts)* est plus faible comparativement aux autres souches. Ceci est en accord avec l'inhibition de la synthèse protéique que nous avons déjà observée auparavant à 28 °C (Baaklini *et al.*, 2004). Sur le gel, on remarque également que notre mutant produit des protéines de faible poids moléculaire (PM) en quantité plus importante que des protéines de haut poids moléculaire (PM). Représenté sur un graphique en fonction du temps, le ratio de protéines de haut PM sur celles de faible PM est inférieur à 1 dans la souche *topA gyrB(Ts)* alors que dans les souches témoins il est égal à 1 (figure 3B). On note également que la vitesse de synthèse symbolisée par la pente des courbes est identique entre les différentes souches. Ceci confirme que les ribosomes fonctionnent de manière similaire dans toutes les souches.

La diminution de protéines totales pourrait être interprétée comme le résultat de la synthèse de protéines tronquées et instables. Le fait que ce phénomène soit surtout visible pour les protéines de haut poids moléculaire indiquerait aussi qu'un plus grand nombre d'ARNm incomplets et traductibles serait produit à partir de la synthèse de gènes de grande taille. Quand l'ARN synthétisé est de grande taille, la fréquence de formation des R-loops devrait augmenter. En effet, plus le gène est long et plus sa transcription introduit du surenroulement négatif au niveau local sur l'ADN (Wu *et al.*, 1988). En absence de topoisomérase I, l'augmentation de ce surenroulement négatif durant la transcription favorise la formation de R-loops (Drolet *et al.*, 1994).

S30 de 28 °C	<i>gyrB</i> (Ts)	<i>gyrB</i> (Ts) <i>topA</i>
L-méthionine S ³⁵ incorporée avec MS2 (en cpm)	2 907 582	3 018 034
L-phénylalanine-C ¹⁴ incorporée avec poly(U) (en cpm)	76 687	73 287

Tableau I : Activité des extraits S30 à 28°C des souches *gyrB*(Ts) et *topA gyrB*(Ts). La quantité de radioactivité moyenne incorporée dans les chaînes d'acides aminés est indiquée pour les différents extraits S30 obtenus en absence et en présence de topoisomérase I et pour les ARN du phage MS2 et l'ARN polyU. Les résultats en cpm représentent la moyenne de deux expériences indépendantes.

Les résultats de cinétiques de synthèse protéique ne montrent pas clairement que des protéines tronquées sont synthétisées. Par contre, ils montrent l'état du profil de protéines dans notre mutant. L'accumulation d'ARNm incomplets et traductibles au détriment d'ARNm de pleine longueur, pourrait être à l'origine de l'altération de la synthèse du profil protéique que nous observons. L'abondance de monosomes associés à des ARNm incomplets en absence de topoisomérase I est une indication de la synthèse de protéines tronquées. En accord avec notre interprétation, des cellules dans lesquelles l'endoribonucléase MazF est surproduite accumulent des ARN incomplets traductibles et montrent une abondance de monosomes (Zhang et *al.*, 2005). MazF est une endoribonucléase qui clive l'ARN. Elle fait parti du système MazEF et ChpBIK toxine-antitoxine (Zhang et *al.*, 2005).

2. Origine des ARN incomplets en absence de topoisomérase I

2.1 Les R-loop et les blocages transcriptionnels

L'accumulation d'ARN incomplets dans le mutant *topA gyrB(Ts)* à 28 °C pourrait être provoquée par un blocage de la transcription suite à la formation de R-loops (Hraiky et *al.*, 2000). Cette hypothèse fut postulée par Hraiky et ses collaborateurs pour tenter d'expliquer la stabilité des ARNr incomplets dans le mutant *topA gyrB(Ts)* (Hraiky et *al.*, 2000). D'après cette hypothèse, un R-loop empêcherait le déplacement d'ARN polymérases qui se trouvent en arrière de lui, ce qui conduirait à un blocage transcriptionnel et un arrêt de la transcription. L'ARN encore emprisonné dans l'ARN polymérase en arrêt serait stabilisé puisqu'il est protégé de l'attaque des ribonucléases. C'est donc seulement après un traitement chimique durant l'extraction d'ARN que les ARN devraient être libérés. Selon le modèle publié par Hraiky et *al.* (Hraiky et *al.*, 2000), si un R-loop peut bloquer la transcription, un empilement d'ARN polymérases serait créé en aval de ce R-loop (figure 3).

Les séquences d'ADN en contact avec les ARN polymérases empilées devraient être protégées de l'action des nucléases spécifiques à l'ADN (DNase). Une expérience d'empreinte sur l'ADN devrait donc nous permettre de vérifier cette hypothèse. Le principe de cette expérience consiste à digérer par des DNases l'ADN non protégé par son association à des protéines. Avant l'ajout de DNases, on lie de manière covalente par traitement chimique

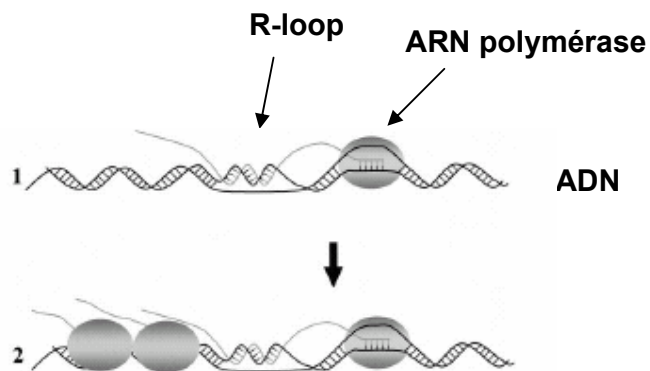


Figure 3 : Modèle du blocage de la transcription par un R-loop. La formation d'un R-loop (1) empêche le déplacement d'ARN polymérases transcrivant à l'arrière du R-loop. Hraiky et *al.*, 2000.

l'ADN et les protéines qui y sont associées. Après l'action de DNases, les protéines sont éliminées par un autre traitement chimique et les séquences d'ADN non digérées sont récupérées et analysées. Les résultats d'empreinte d'ADN dans le mutant *topA gyrB(Ts)* à 28 °C ne montrent pas des séquences d'ADN protégées dans cette souche (Kraiky et Drolet, résultats non publiés). Ces données ne supportent donc pas le modèle qu'un R-loop provoquerait un empilement d'ARN polymérases dans le mutant *topA gyrB(Ts)* à 28 °C.

L'absence d'un empilement d'ARN polymérase en arrière d'un R-loop pourrait s'expliquer par un décrochage de l'ARN polymérase et une terminaison prématurée de la transcription. Une terminaison prématurée de la transcription est en accord avec la production d'ARN incomplets dans notre mutant. Avant la terminaison de la transcription, le complexe de transcription doit ralentir son incorporation de nucléotides et adopter un état de pause. Une halte du complexe de transcription permet au facteur Rho de rattraper l'ARN polymérase et de la faire décrocher de l'ADN (Landick, 2006). Lors d'une pause, l'ARN polymérase change de conformation et modifie l'emplacement de son site actif (Erie et *al.*, 1993; Artsimovitch et Landick, 2000). La durée d'une pause dépend souvent de la concentration de ribonucléotides (rNTP) libres et de la nouvelle conformation adoptée par l'ARN polymérase (Greive et von Hippel, 2005). Après une pause, l'ARN polymérase peut reprendre la transcription, terminer la transcription ou encore être arrêtée. La hauteur de la barrière énergétique qu'il faut franchir lors du passage d'un état de pause vers un nouvel état, détermine si l'ARN polymérase reprend, termine ou arrête la transcription (von Hippel, 2006).

Pour l'instant, on ne sait pas encore comment un R-loop peut influencer le déplacement d'ARN polymérases en amont de lui. On ne sait pas non plus si les R-loops peuvent induire des pauses transcriptionnelles. On ne sait pas non plus quel est le niveau de barrière énergétique que l'ARN polymérase aurait à franchir face à un R-loop, pour passer d'un état de pause vers un autre état. Chez les bactéries, la synthèse des ARNm est couplée à leur traduction. La présence de ribosomes sur l'ARNm protège cet ARNm de la terminaison Rho dépendante et de la dégradation par les ribonucléases. Nous avons montré que dans le mutant *topA gyrB(Ts)*, les ARNm synthétisés sont associés aux ribosomes. Il est donc moins probable que des événements associés à la terminaison Rho dépendante surviennent au niveau des ARNm dans notre mutant *topA gyrB(Ts)*.

L'idée qu'un R-loop pourrait constituer une barrière physique au déplacement d'ARN polymérases est aussi discutable. Des barrières physiques sur l'ADN comme par exemple des

protéines de type histones associées à l'ADN (Introduction section 3), n'inhibent pas le déplacement de l'ARN polymérase *in vivo* alors qu'elles peuvent le compromettre *in vitro* (Pavco et Steege, 1990; Izban et Luse, 1991; Reines et Mote, 1993). Ceci indique que certains facteurs manquants dans les réactions *in vitro* favorisent *in vivo* la transcription à travers des obstacles sur l'ADN. Parmi ces facteurs, on peut citer GreA/GreB qui aident l'ARN polymérase à transcrire à travers des séquences d'ADN qui se lient à des protéines (Reines et Mote, 1993; Toulmé et *al.*, 2000). En clivant le bout 3' de l'ARN pour libérer le site actif de l'enzyme, les facteurs GreA/GreB viennent secourir et réactiver une ARN polymérase dans un état dit de « backtrack », (Borukhov et *al.*, 1993; Artsimovitch et Landick, 2000). Un état de « backtrack » est une situation dans laquelle l'ARN polymérase est arrêtée. Cette situation survient lorsqu'une translocation vers l'arrière du complexe de transcription libère le bout 3' de l'ARN à travers le canal secondaire de l'ARN polymérase (Korzheva et Mustaev, 2001; Komissarova et Kashlev, 1997 a et b; Nudler et *al.*, 1997). Plusieurs cycles de clivages de l'ARN et de reprise de la transcription permettraient à un complexe d'élongation de transcrire à travers des barrières physiques sur l'ADN. La coopération entre ARN polymérases arrêtées peut aussi aider la transcription à traverser des obstacles sur l'ADN. Des ARN polymérases situées en arrière d'une ARN polymérase dans un état « backtrack » poussent cette dernière vers l'avant, lui permettant de passer à travers un obstacle sans qu'il soit nécessaire de cliver l'ARN (Epshtein et Nudler, 2003; Epshtein et *al.*, 2003). Cette coopération entre ARN polymérases est possible en milieu de croissance riche car dans ces conditions, plusieurs ARN polymérases transcrivent simultanément le même gène (Epshtein et *al.*, 2003). La présence de GreA/GreB et la coopération entre ARN polymérases pourraient aider l'ARN polymérase à traverser un R-loop. Chez les bactéries, la fréquence de transcription des ARNm est très faible comparée à celle des ARNr, et la coopération entre les ARN polymérase transcrivant des ARNm est donc peu probable. De plus, des blocages transcriptionnels dus aux R-loops devraient également arriver plus rarement au niveau des ARNm puisqu'ils ne sont pas fréquemment transcrits. Dans nos travaux, nous montrons que l'inhibition de la synthèse protéique est provoquée par un défaut de la synthèse des ARNm plutôt que par un défaut de la synthèse des ARNr. Ceci diminue considérablement l'importance qu'aurai des blocages transcriptionnels dans l'inhibition de la synthèse protéique.

Il existe peu d'évidences *in vivo* qui montrent qu'un R-loop puisse constituer un blocage de la transcription. Chez la levure *Sacharomyces cerevisiae*, il a été montré *in vivo* que des R-loops qui se forment dans des mutants THO/THREX causent une inhibition de l'élongation de

la transcription (Huertas et Aguilera, 2003). Dans une autre étude récente, les mêmes auteurs montrent *in vitro* qu'un R-loop de 300 nucléotides formé sur un ADN négativement surenroulé diminue de 50% l'efficacité de transcription de l'ARN polymérase II (RNAPII) de la levure (Tous et Aguilera, 2007). Cette inhibition de la transcription est réversible lorsque la RNase HI est présente dans les réactions de transcription *in vitro*. Également *in vitro*, la transcription en continu d'un gène sans terminateur sur un ADN circulaire inhibe aussi la transcription, à moins que la ribonucléase A (RNase A) ou la RNase HI soit présente (Bentin *et al.*, 2005). La RNase A est une ribonucléase qui clive l'ARN libre non associé à des protéines. Dans le cas de cette dernière étude, la RNase A clive donc l'ARN naissant à sa sortie de l'ARN polymérase. L'action de la RNase A dans ces essais de transcription aurait comme effet d'augmenter le nombre de complexes de transcription actif. La formation de R-loops auraient alors comme effet de diminuer le nombre de complexes de transcription actif en constituant un obstacle à leur déplacement (Bentin *et al.*, 2005). Pourtant, il a été montré *in vitro* qu'un R-loop présent sur un plasmide n'affecte pas vraiment l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase (Bentin et Nielsen, 2002). D'après l'étude de Bentin et Nielsen, il semblerait que l'ARN polymérase soit capable de transcrire à travers un R-loop.

Les évidences les plus directes qui suggèrent qu'un R-loop peut bloquer la transcription nous viennent donc d'essais *in vitro* (Tous et Aguilera, 2007). On ne peut alors pas transposer ces résultats à des situations similaires *in vivo* puisque plusieurs facteurs présents *in vivo* pourraient jouer un rôle déterminant dans ce processus. L'un des ces facteurs est la RNase HI. Encore active à 28 °C dans le mutant *topA gyrB(Ts)*, cette enzyme pourrait diminuer la stabilité des R-loops et empêcher qu'ils deviennent un obstacle pour la transcription. La dégradation de l'ARN dans les R-loops empêcherait non seulement le blocage des ARN polymérases, mais pourrait également être tenue responsable de la production d'ARN incomplets.

La possibilité qu'un R-loop puisse causer des blocages transcriptionnels est donc très discutable. Il est prématuré aujourd'hui de confirmer ou d'exclure l'hypothèse que le blocage de la transcription par un R-loop puisse être à l'origine de la production d'ARN incomplets. Des investigations supplémentaires sont alors nécessaires pour répondre à cette question. On pourrait tester la possibilité que des R-loops puissent provoquer la terminaison prématurée. On pourrait aussi vérifier l'implication de GreA/GreB ou d'autres facteurs susceptibles de

jouer un rôle dans le blocage de la transcription par un R-loop. La stabilité des R-loops dans le mutant *topA gyrB(Ts)* est également une question qui mérite une attention particulière.

2.2 Stabilité des R-loops et leurs effets sur l'expression génique

Un R-loop stable comparativement à un R-loop instable pourrait plus facilement inhiber la transcription en constituant un obstacle pour le déplacement des ARNs polymérases. La RNase HI qui joue un rôle déterminant dans la stabilité des R-loops pourrait alors influencer les effets de ces R-loops sur l'expression génique. Des R-loops stables sont en général à l'origine de phénomènes de recombinaison et d'instabilités génomiques (Introduction section 6.4 à 6.5). Dans un mutant déficient en RNase HI, les R-loops stables déclenchent en effet la réponse SOS et le cSDR de façon chronique. Cependant, on ne sait pas si ces R-loops stables inhibent également l'expression génique. Lorsque la topoisomérase I est inactivée dans le mutant *rnhA*, ceci conduit à la mort cellulaire (Drolet et *al.*, 1995). Des moyens pour contrôler la formation de R-loops ont donc été développés par les cellules. Afin de prévenir d'éventuels dommages à l'ADN et éviter que les activités génomiques ne soient affectées, les cellules maintiennent un minimum de contrôle sur la formation des R-loops grâce à l'activité de la RNase HI et celle de la topoisomérase I. La RNase HI agit en éliminant les R-loops alors que la topoisomérase I prévient leur formation. Ces deux enzymes jouent donc un rôle complémentaire dans le même mécanisme. Les R-loops présents dans le mutant *rnhA* pourraient alors avoir des effets sur l'expression génique similaires à ceux observés en absence de topoisomérase I.

À 37 °C et à 28 °C, la croissance et la synthèse de β -galactosidase sont tous les deux altérés dans le mutant *rnhA* (Article 2 figure 1 et 2). L'effet de l'absence de RNase HI sur la croissance et la synthèse de β -galactosidase est cependant beaucoup moins sévère qu'en absence de topoisomérase I (Baaklini et *al.*, 2004). La synthèse de *crp* et de *lacZ* est également affectée dans le mutant *rnhA* mais contrairement au mutant *topA gyrB(Ts)*, aucun ARN incomplet n'est produit (Article 2, figure 3). On constate tout simplement une diminution dans l'expression de ces deux ARN. Les R-loops sont bien responsables de cette inhibition de l'expression de *crp* et de *lacZ* puisque la surproduction de la RNase HI corrige le problème. Des R-loops qui se forment en absence de topoisomérase I affectent aussi négativement l'expression des facteurs de résistance aux stress de hautes températures et oxydatifs (Cheng et *al.*, 2003; Introduction section 6.7). La survie au stress non léthal de 41 °C requiert la synthèse transitoire de protéines de stress comme DnaK et GrpE. C'est

l'accumulation du facteur de transcription σ_{32} qui est responsable de la synthèse des ces gènes. L'accumulation de σ_{32} est également transitoire à cause de la stabilisation momentanée de son ARN *rpoH*. Aidée par σ_{32} , la transcription des gènes *dnaK* et *grpE* est aussi transitoire mais surtout très intense au début du stress. Dans le mutant *rnhA*, un délai dans la synthèse de σ_{32} cause un retard dans l'expression de *dnaK* et de *grpE*. Par Western blot, on constate par conséquent que l'expression de DnaK est retardée (Article 2, figures 4 et 5). L'expression de *lacZ* et de *crp* est également affectée à haute température de la même manière qu'à 37 °C. La formation de R-loops au niveau des gènes de stress fortement transcrits serait responsable de ce retard dans l'expression génique. La surproduction de la RNase HI corrige en effet le retard dans l'expression des facteurs de stress. De même, la surproduction de la RNase HI rétablit l'expression de *crp* et de *lacZ* à hautes températures et améliore grandement le taux de survie à 51°C (Article 2, figures 4, 5 et 6).

La réponse SOS et le cSDR pourraient être à l'origine de cette inhibition de l'expression génique. Dans ce cas, les R-loops stables auraient des effets indirects sur l'expression génique. Les nombreux événements de recombinaison et de réplication qui ont lieu dans le mutant *rnhA*, peuvent affecter la transcription en perturbant localement l'ADN et les activités génomiques. En occupant de l'espace génomique sur l'ADN, en changeant la conformation de l'ADN et la régulation génique ou en causant des collisions entre polymérases ARN et ADN, la recombinaison ou la réplication pourraient entrer en conflit avec les événements de transcriptions (Olavarieta et *al.*, 2002; Camps et Loeb, 2005, section 6.6 et 6.4). L'élimination de RecA qui est le facteur essentiel pour déclencher le cSDR et la réponse SOS, indiquerait si ces deux processus sont impliqués dans l'inhibition de l'expression génique du mutant *rnhA*. Dans la souche *rnhA*, l'inactivation de RecA ne restaure pas la synthèse de β -galactosidase au même niveau qu'une souche *rnhA*⁺ (tableau II). La réponse SOS et le cSDR ne sont donc pas impliqués dans l'inhibition de l'expression génique du mutant *rnhA*.

Dans le mutant *rnhA*, la stabilité des R-loops pourrait mener à des blocages transcriptionnels et être à l'origine de l'inhibition de l'expression génique. L'inactivation du facteur Rho dans le mutant *rnhA* rend cette souche très malade (Article 2, figure 9). En absence du facteur de terminaison Rho, la fréquence de terminaison de la transcription devrait diminuer. Ceci indique que la terminaison Rho dépendante de la transcription joue un rôle important pour diminuer les effets négatifs des R-loops. Le facteur de terminaison Rho serait peut être

β -galactosidase (unités Miller)			
Souches	37°C	28°C	42°C
WT	372 (+/-113)	75 (+/-23)	432 (+/-72)
<i>rnhA</i>	326 (+/-70)	40 (+/-12)	425 (+/-32)
<i>recA</i>	268 (+/-74)	54 (+/-7)	467 (+/-95)
<i>rnhA recA</i>	134 (+/-16)	23 (+/-2)	203 (+/-30)

Tableau II : Synthèse de β -galactosidase dans le mutant *rnhA recA*. Cette expérience a été réalisée de façon identique à celle de la figure 1 de l'article 2 pour les températures de 37 °C, 28 °C et 42 °C. L'IPTG à 28 °C et 42 °C a été ajouté après 20 minutes d'incubation et les échantillons ont été récoltés après 2 minutes d'induction. Le nombre d'unité Miller de β -galactosidase a été calculé comme indiqué auparavant (Baaklini et *al.*, 2004). La moyenne et l'écart type de la moyenne ont été calculés à partir de trois expériences réalisées de façon indépendantes.

nécessaire pour désengager l'ARN polymérase et libérer l'ADN des blocages transcriptionnels. Des mutations dans des facteurs d'antiterminaisons sont également nuisibles au mutant *rnhA*, puisque des cellules *nusB rnhA* sont très malades et le mutant *rnhA nusG* n'est pas viable (Harinarayanan et Gowrishankar, 2003). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la présence de facteurs d'antiterminaison est requise pour permettre à la cellule de synthétiser un minimum d'ARN. Un juste équilibre entre terminaison de la transcription et l'antiterminaison de la transcription est donc essentiel en absence de RNase HI. Comme c'est le cas dans certains essais *in vitro* (Tous et Aguilera, 2007; Bentin et *al.*, 2005), les R-loops stables en absence de RNase HI pourraient diminuer le nombre de complexes de transcription actifs en constituant des obstacles à la transcription. L'importance du facteur de terminaison Rho pour la survie du mutant *rnhA* supporte bien cette idée. En absence de Rho, un plus grand nombre d'ARN polymérases resteraient bloquées ce qui aurait des effets négatifs sur l'expression génique et la croissance. L'expression réduite de *lacZ* et de *crp*, de même que le retard dans la synthèse et l'accumulation de facteurs de stress pourraient bien s'expliquer par une diminution de la fréquence de transcription causée par un R-loop bloquant la transcription. L'effet du surenroulement sur l'initiation de la transcription pourrait également expliquer cette inhibition de l'expression génique. Dans le mutant *topA rnhA*, l'ADN est moins surenroulé négativement que dans une souche de type sauvage (Usongo et *al.*, 2008). Or, la présence de surenroulement négatif minimum dans l'ADN est nécessaire à la formation de complexes de transcriptionnels ouverts (Introduction section 5.1)

Le mécanisme par lequel les R-loops du mutant *rnhA* inhibent l'expression génique demeure encore une énigme. Nous pouvons par contre affirmer que les R-loops formés en absence de RNase HI inhibent l'expression génique sans que des ARN incomplets ne soient produits. Ceci constitue une différence majeure avec le mutant *topA gyrB(Ts)*. La stabilité des R-loops n'étant pas pareille entre les deux souches, elle devrait alors être l'élément qui fait la différence entre ces deux effets. L'absence de réponse SOS et du cSDR dans le mutant *topA gyrB(Ts)* indique en effet que les R-loops ne sont pas assez stables en l'absence de topoisomérase I (Drolet et *al.*, 1995). La RNase HI qui contrôle la stabilité des R-loops est donc un facteur déterminant dans les effets que peuvent avoir les R-loops sur l'expression génique.

2.3 L'hypersurenroulement négatif et la production d'ARN incomplets

L'idée que la RNase HI soit responsable de la production d'ARNm incomplets est très pertinente. Pourtant, cette possibilité est en contradiction avec le fait que la surproduction de la RNase HI favorise la production d'ARN de pleine longueur (Baaklini et *al.*, 2004). Il est en effet paradoxal que cette enzyme qui a pour activité de dégrader l'ARN puisse aussi aider à la production d'ARN de pleine longueur quand elle est surproduite. Nous savons qu'en absence de topoisomérase I, la transcription génère un excès de surenroulement négatif selon le modèle du « twin domain supercoil » (Massé et Drolet, 1999a; Liu et Wang, 1987). L'excès de surenroulement négatif qui s'accumule en absence de topoisomérase I favorise la formation de R-loop et la création d'hypersurenroulement négatif (Massé et Drolet, 1999 a et b). Dans des essais de transcription *in vitro* en présence de gyrase et en absence de topoisomérase I, la RNase HI a un effet très clair sur l'apparition d'hypersurenroulement négatif. Lorsqu'elle est en excès, on ne remarque pas d'hypersurenroulement négatif et quand elle est en faible quantité ou absente, on remarque la présence d'hypersurenroulement négatif (Phoenix et *al.*, 1997).

Comme la seule activité possible de la RNase HI est la dégradation de l'ARN d'un R-loop, son effet sur l'hypersurenroulement négatif est indirect et passe absolument par l'intermédiaire de l'élimination du R-loop. La surproduction de la RNase HI aurait donc deux effets majeurs en absence de topoisomérase I. Le premier est de favoriser la production d'ARN de pleine longueur, le deuxième est d'inhiber l'hypersurenroulement négatif. La RNase HI dans des concentrations physiologiques n'empêche pas l'accumulation de surenroulement négatif et ne favorise pas la production d'ARN pleine longueur (Massé et Drolet, 1999b; Baaklini et *al.*, 2004; Hraiky et *al.*, 2000). Il existerait donc un lien entre la concentration de RNase HI, l'accumulation de surenroulement négatif et la production d'ARN incomplets en absence de topoisomérase I. Pour établir un tel lien, nous avons mesuré le niveau de surenroulement négatif à différents moments pendant l'inhibition transitoire de la croissance de notre mutant. Les résultats de cette expérience montrent qu'à une température de 28 °C, l'inhibition transitoire de la croissance corrèle parfaitement avec la présence d'hypersurenroulement négatif (Article 1, figure 1a). Lorsque la RNase HI est en concentration physiologique, l'hypersurenroulement négatif se maintient aussi longtemps que la croissance est inhibée. Quand la croissance reprend, l'hypersurenroulement négatif commence à disparaître. Dans la souche qui surproduit la RNase HI, la croissance n'est pas

inhibée à 28 °C et aucun hypersurenroulement négatif n'est présent. À une température de 26 et de 21 °C, on aperçoit de façon étonnante une inhibition très brève de la croissance et l'apparition d'hypersurenroulement négatif dans la souche qui surproduit la RNase HI (Article 1, figure 1b et 1c). Plus la température est basse, plus l'inhibition transitoire de la croissance est longue et plus l'hypersurenroulement négatif s'accumule. Quand la RNase HI n'est pas surproduite en absence de topoisomérase I, il y a beaucoup plus d'hypersurenroulement négatif qui s'accumule et l'inhibition de la croissance est très longue à basse température. À 28 °C, la surproduction de la RNase HI réduit alors l'accumulation d'hypersurenroulement négatif de façon significative. Mais plus on baisse la température, plus son efficacité semble diminuer. En effet, à 21 et à 26 °C la surproduction de la RNase HI n'empêche pas l'apparition d'hypersurenroulement négatif mais en réduit plutôt son accumulation. La stabilisation de l'hypersurenroulement négatif à basse température par un mécanisme encore inconnu ou l'inactivation à basse température de certains facteurs de régulation du surenroulement négatif, pourraient expliquer ce phénomène. L'inhibition transitoire de la croissance corrèle donc parfaitement avec l'accumulation d'hypersurenroulement négatif. Tout en prévenant l'accumulation d'hypersurenroulement négatif en absence de topoisomérase I, la surproduction de la RNase HI facilite aussi la production d'ARN pleine longueur et permet la croissance.

La production d'ARN incomplets est conséquemment liée à la présence d'hypersurenroulement négatif. Deux facteurs connus influencent la formation de R-loops : le niveau de surenroulement négatif et la richesse en bases G sur l'ADN complémentaire à l'ARN (Introduction section 5.3 et 5.4). La transcription du fragment HindIII riche en bases G et la transcription d'une séquence de la région CSR des immunoglobulines forment des R-loops quand ils sont transcrits dans le sens physiologique (Yu et *al.*, 2003; Massé et Drolet, 1997). Dans le sens physiologique, ces deux fragments sont riches en bases G alors que dans le sens non physiologique elles sont riches en bases C. Quand l'ADN est hypersurenroulé négativement, la transcription de ces deux fragments forment des R-loops peu importe le sens de la transcription (Article 1, figure 8). L'ADN hypersurenroulé négativement favorise donc la formation de nombreux R-loops non spécifiques. La surproduction de la RNase HI diminue considérablement la formation de R-loops en prévenant l'accumulation d'hypersurenroulement négatif. Lorsque la RNase HI est en concentration physiologique, l'hypersurenroulement négatif peut donc s'accumuler favorisant la formation de nombreux R-loops non spécifiques. L'effet de la surproduction de la RNase HI est donc d'éviter la

formation de nombreux R-loops et les ARN incomplets qui en résultent, en empêchant l'accumulation d'hypersurenroulement négatif.

Selon le modèle du « R-loop self promoting cycle » (Drolet 2006), l'accumulation d'hypersurenroulement négatif en absence de topoisomérase I est dépendante de la concentration de RNase HI et de l'activité de surenroulement négatif de la gyrase (Drolet 2006; introduction 5.5). L'effet de la surproduction de la RNase HI sur l'accumulation d'hypersurenroulement négatif ainsi que la formation de R-loops non spécifiques quand l'ADN est hypersurenroulé négativement, supportent le modèle du « R-loop self promoting cycle ». D'après ce modèle, la dégradation des R-loops est essentielle à la diffusion du surenroulement négatif et à son accumulation. La dégradation de l'ARN des R-loops par la RNase HI pourrait alors être tenue responsable de la production d'ARN incomplets.

La diminution de l'hypersurenroulement négatif en absence de topoisomérase I lorsque la croissance reprend est très étonnante (Article 1, figure 1a). En effet, la gyrase qui est responsable de l'introduction du surenroulement négatif devrait encore être active et introduire du surenroulement négatif. Un scénario possible serait que l'activité de la gyrase soit diminuée à cause d'une réduction dans le ratio ATP/ADP. Ceci se produirait suite à la consommation des réserves énergétiques de la cellule par la surinitiation des ARNr (Hraiky et al., 2000). Une autre possibilité serait que la topoisomérase IV ou la topoisomérase III relaxerait l'excès de surenroulement négatif. La topoisomérase IV étant surtout occupée dans la ségrégation des chromosomes et la topoisomérase III dans la recombinaison, la présence de surenroulement négatif en grande quantité pourrait rediriger l'activité de ces deux enzymes vers ce substrat en excès. Récemment, une étude a démontré que la topoisomérase IV a la capacité de diminuer l'accumulation d'hypersurenroulement négatif en l'absence de topoisomérase I (Usongo et al., 2008). En s'associant à l'ADN, des nombreuses protéines de type Histones ou encore des SMC pourraient également restreindre le surenroulement négatif et le contrôler (Introduction section 3.1.2 et 3.1.3). Ces protéines pourraient empêcher la diffusion du surenroulement négatif et pourraient diminuer son accumulation. Enfin, la RNase HI en concentration physiologique pourrait après un certain temps venir à bout des nombreux R-loops ce qui diminuerait le niveau de surenroulement négatif. Toutes ces possibilités contribueraient de façon individuelle ou simultanée à abaisser le niveau de surenroulement négatif lors de la reprise de croissance.

Les cellules déficientes en topoisomérase I ont tendance à accumuler des mutations compensatoires dans la gyrase afin de diminuer son activité de surenroulement négatif (Pruss et *al.*, 1982; Hammond et *al.*, 1991; Introduction section 2.3). La diminution du surenroulement négatif lors de la reprise de la croissance en absence de topoisomérase I s'inscrit dans le même principe. En contrôlant l'excès de surenroulement négatif, la cellule diminue la formation des R-loops et favorise la croissance. La cellule possède donc d'autres moyens que l'action de la topoisomérase I pour contrôler l'excès de surenroulement négatif. Cependant, ces moyens alternatifs semblent être moins efficaces que la topoisomérase I pour contrôler le surenroulement négatif. Il serait intéressant d'examiner ces possibilités afin de découvrir de nouveaux facteurs impliqués dans la régulation du surenroulement négatif et dans la formation des R-loops.

2.4 La dégradation des ARN et la production d'ARN incomplets : le rôle de la RNase HI

Afin de vérifier si les ARNm incomplets sont des produits de dégradation, nous avons réalisé des expériences de stabilité de l'ARN. Le principe de ces expériences est d'arrêter la synthèse d'ARN et de suivre dans le temps le destin de l'ARN déjà produit. La synthèse de l'ARN est arrêtée par l'ajout de rifampicine, un antibiotique qui empêche l'ARN polymérase d'initier la transcription, supprimant ainsi tout nouveau cycle de transcription. Grâce à un oligonucléotide spécifique à *fis*, on détecte par Northern Blot au temps zéro de l'ajout de rifampicine, la présence de l'ARN *yhdG-fis* et de *fis* dans les souches *gyrB*(Ts) et *topA gyrB*(Ts) qui surproduisent la RNase HI (Article 1, figure 5). Normalement, *yhdG-fis* est mûré par endoclivage ce qui donne deux produits *yhdG* et *fis* (Ball et *al.*, 1992). On note effectivement qu'après l'ajout de rifampicine, la maturation se déroule normalement dans ces deux souches. Dans le mutant *topA gyrB*(Ts) à 28 °C, on remarque au moment de l'ajout de rifampicine et après, la présence de *yhdG-fis* mais pas celle de *fis*. *fis* est remplacé par une trainée visible à l'endroit où doit se trouver sa bande. Ceci est en accord avec le fait que *fis* est difficilement détectable dans le mutant *topA gyrB*(Ts) à 28 °C (Baaklini et *al.*, 2004). En absence de topoisomérase I, la maturation de *yhdG-fis* ne se déroule donc pas de façon normale.

Quand on regarde *yhdG* avec un oligonucléotide spécifique à sa région 5', on remarque qu'en absence de topoisomérase I plusieurs ARN incomplets stables s'accumulent (figure 4A). Ces fragments d'ARN plus petits que l'ARN polycistronique sont détectables uniquement dans la souche *topA gyrB*(Ts) et sont déjà visibles au temps zéro de l'ajout de rifampicine. De façon

continue dans le temps, chaque ARN incomplet disparaît un à la fois dans un ordre décroissant en fonction de leur poids moléculaire. Dans les cellules *gyrB*(Ts) et *topA gyrB*(Ts) qui surproduisent la RNase HI, l'ARN pleine longueur *yhdG-fis* est vite dégradé au profit d'un ARN de petite taille, l'ARN *fis*.

Le traitement de nos cellules avec un inhibiteur de la synthèse protéique fait en sorte que tous les fragments d'ARN incomplets de *yhdG* présents dans la souche *topA gyrB*(Ts) deviennent également visibles dans les souches témoins (figure 4B). Un inhibiteur de la synthèse protéique stabilise l'ARN à cause d'une pénurie de ribonucléases provoquée par la surinitiation des ARNr (Lopez et al., 1998). Lorsque la synthèse protéique est totalement inhibée par un antibiotique, le processus de dégradation est alors ralenti et l'on peut constater l'accumulation d'intermédiaires de dégradation. Puisque les ARN incomplets de la souche *topA⁻* se retrouvent dans les souches *gyrB*(Ts), ces ARN devraient être des intermédiaires de dégradation de l'ARN pleine longueur plutôt que le résultat de blocages transcriptionnels. En effet, l'ARN en amont de blocages transcriptionnels ne devrait pas être synthétisé et l'ARN pleine longueur indétectable. La stabilité des intermédiaires de dégradation de *yhdG* pourrait s'expliquer par une pénurie de nucléases, comme c'est le cas lors de l'ajout d'un inhibiteur de la synthèse protéique. Ceci est pourtant peu vraisemblable puisqu'une pénurie de ribonucléases devrait stabiliser aussi bien l'ARN de *fis* que celui de *yhdG*. Dans le mutant *topA gyrB*(Ts), il semble plutôt que le processus de dégradation de *yhdG* est ralenti alors que la dégradation de *fis* est accélérée. Le gène *lacA* de l'opéron lactose se comporte également comme *fis*. *LacA* qui est le troisième gène de l'opéron lactose est maturé par endoclivage de la RNase P et la RNase E dans la région intergénique entre *lacA* et *lacY* (Li et Altman, 2004). Dans la souche *topA⁺*, on observe trois produits de maturation de l'ARN polycistronique de l'opéron lactose (*lac*) : *lacZ*, *lacY* et *lacA* (Article 1, figures 6 et 7). Dans la souche déficiente en topoisomérase I, les produits de maturation de l'ARN pleine longueur et polycistronique *lac*, c'est-à-dire les produits *lacZ* et *lacA* sont remplacés par une traînée au lieu d'une bande claire. Ceci est le signe que *lacZ* et *lacA* sont synthétisés mais qu'ils sont très vite dégradés. L'ensemble de ces résultats suggère que les ARNm sont normalement synthétisés dans le mutant *topA gyrB*(Ts) à 28 °C mais qu'ils sont anormalement dégradés.

L'événement qui déclenche le processus de dégradation de l'ARN chez *Escherichia coli* est l'endoclivage (Codon 2007; figure 5). L'endoribonucléase RNase E a un rôle principal dans

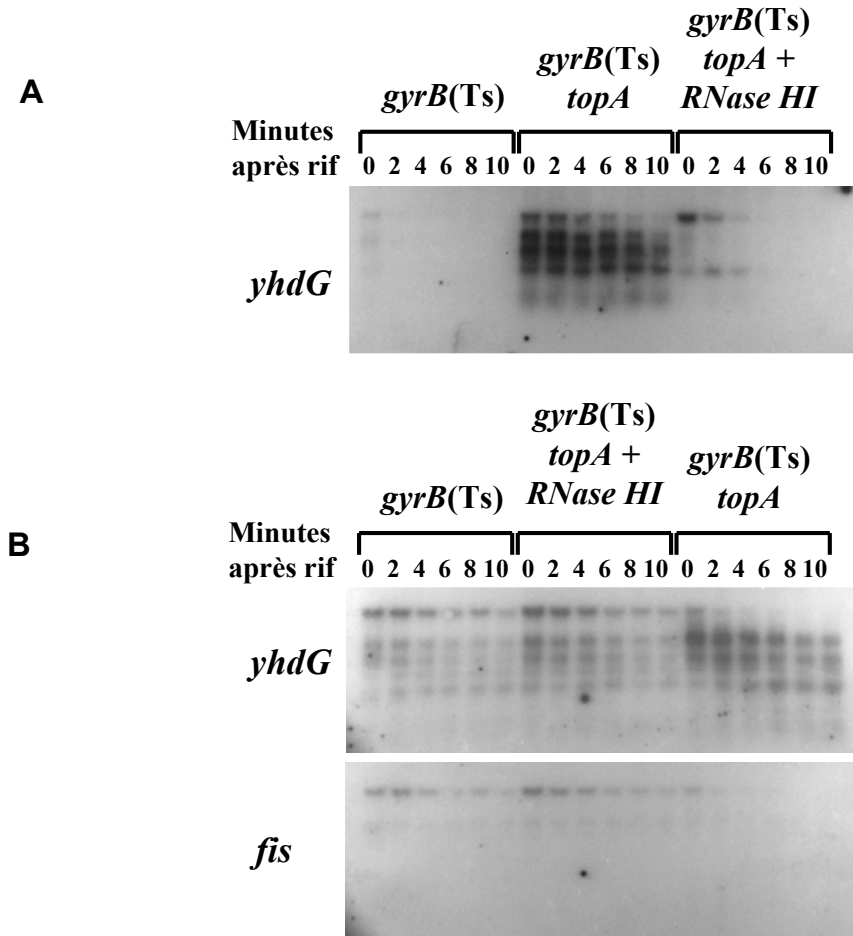


Figure 4 : La stabilité de *yhdG* et de *fis* à 28 °C en absence de topoisomérase I. **(A)**, Stabilité de *yhdG* en fonction du temps après ajout de rifampicine. Cette expérience a été réalisée de façon identique à celle de la figure 5 de l'article 1, avec l'exception qu'une sonde oligonucléotide spécifique à la région 5' de *yhdG* a été utilisée (Baaklini et *al.*, 2004). **(B)**, stabilité de *yhdG* et *fis* après ajout de rifampicine en présence de spectinomycine, un inhibiteur de la synthèse protéique. Cette expérience a été réalisée de façon identique à celle en A pour l'ARN *yhdG* et identique à celle de la figure 5 de l'article 1 pour *fis*. La seule différence est que la spectinomycine a été ajoutée 15 minutes à 37°C avant le transfert des cellules à 28°C.

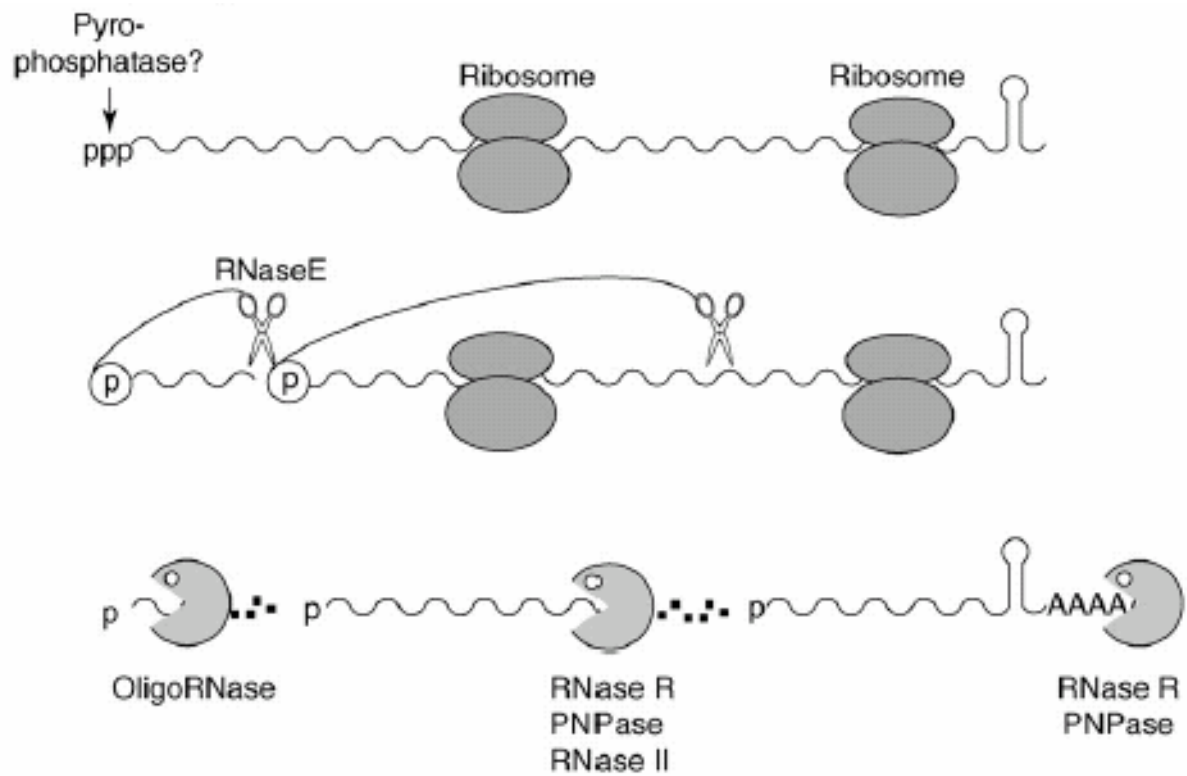


Figure 5 : Principal mode de dégradation de l'ARN chez *Escherichia coli*. Condon 2007.

ce processus, alors que d'autres endoribonucléases y jouent un rôle mineur (la RNase G, RNase III, RNase P et la RNase Z) (Iost et Dreyfus, 1995; Carpousis, 2007).

La RNase E reconnaît les extrémités phosphates libres d'un ARN simple brin et s'y attache grâce à la présence d'au moins 4 nucléotides. Bien qu'elle puisse reconnaître les extrémités 5' d'un ARN triphosphorylées, la RNase E a une grande préférence pour les extrémités ARN 5' monophosphorylées (Mackie, 1998; Mackie 2000). L'extrémité 5' du transcrit est donc partiellement protégée de la dégradation en raison de la présence de 3 phosphates. Dans une étude récente, il est suggéré qu'une pyrophosphatase enlèverait les phosphates en 5' sur l'ARN pour produire des extrémités 5' monophosphates, permettant à la RNase E d'agir plus efficacement aux extrémités 5' de l'ARN (Celesnick et *al.*, 2007). L'existence de la pyrophosphatase suggérée par l'abondance de produits 5' ARN monophosphorylés dans la cellule, fut récemment confirmée (Deana et *al.*, 2008).

En raison de l'absence d'extrémités phosphatées, le bout 3' de l'ARN n'est pas accessible à la RNase E. Ce sont les exoribonucléases qui possèdent la capacité de dégrader l'ARN à partir de son extrémité 3'. Les exoribonucléases dégradent l'ARN de son extrémité 3' vers la 5' de manière processive. Cependant, en raison des structures secondaires qui sont présentes en 3' de l'ARN, même les exoribonucléases ont des difficultés à dégrader l'ARN à partir de son extrémité 3'. L'ARN issu de l'endoclivage est donc un substrat plus facile d'accès pour les exonucléases puisque qu'il ne devrait pas posséder de structures secondaires en 3'. Les principales exoribonucléases chez *E. coli* sont : la RNase II, la PNPase et la RNase R. La RNase II dégrade uniquement des ARN simples brins dépourvus de structures secondaires. La PNPase et la RNase R peuvent dégrader l'ARN possédant des structures secondaires à condition que la polymérase PAP1 synthétise une queue polyA à l'extrémité 3' de l'ARN. Chez *E. coli*, la dégradation de l'ARN commence donc par un endoclivage 5' vers 3', lequel est suivi par un exoclivage 3' vers 5' des fragments générés par l'endoclivage. Ceci implique alors que la dégradation de l'ARN a une polarité nette de 5' vers 3' (Coburn et Mackie, 1999).

La RNase E étant l'endoribonucléase majeure chez *E. coli*, elle pourrait être impliquée dans la dégradation de l'ARN en absence de topoisomérase I. Nous avons donc inactivé la RNase E dans notre mutant dans l'espoir de voir le profil de nos ARNm changer. En absence de topoisomérase I, l'inactivation de la RNase E ne change pas le fait que l'ARN *lacA* soit dégradé. L'inactivation de la RNase E a plutôt tendance à stabiliser tout les d'ARN qu'ils

soient de pleine longueur ou courts (résultats non publiés). Il a été démontré en effet qu'une délétion de la RNase E augmente la stabilité de l'ARN (Iost et Dreyfus, 1995). Ce résultat indique que la dégradation de l'ARN dans la souche *topA gyrB(Ts)* est un événement qui a lieu avant l'action de la RNase E. Le clivage de l'ARN des R-loops par la RNase HI pourrait être à l'origine de ce phénomène. Un clivage de l'ARN par la RNase HI fournit une extrémité 5' monophosphatée pour l'ARN en aval du R-loop et une extrémité OH pour l'ARN en amont du R-loop (Crouch et Dirksen, 1982; Introduction section 5.2). La production de nombreux ARN aux extrémités monophosphatées serait un substrat de choix pour le RNase E. L'ARN issue de la dégradation par la RNase HI en aval du R-loop serait alors très vite dégradé. L'ARN en amont du R-loop dont l'extrémité 5' est triphosphorylé, serait dégradé moins rapidement comparativement à l'ARN en amont (figure 7). Les exoribonucléases y auraient pourtant un meilleur accès à cause de son extrémité 3' OH. Mais, leur action étant processive, elles pourraient être ralenties par d'autres structures secondaires présentes en amont sur l'ARN. Ceci expliquerait pourquoi la dégradation de *fis* et *lacA* est très rapide comparativement à celle de *yhdG*.

Pour tester l'hypothèse que la RNase HI est responsable de la dégradation de l'ARN dans les souches déficientes en topoisomérase I, nous avons inactivé le gène *rnhA* de notre mutant *topA gyrB(Ts)* et vérifié si des ARN pleine longueur peuvent s'accumuler à nouveau. Comme c'est le cas du double mutant *topA rnhA* (Drolet et al., 1995), ce triple mutant n'est pas viable. Un plasmide sous le contrôle de l'arabinose produit de la RNase HI et permet à la souche de survivre (Usongo et al., 2008). Quand l'arabinose est enlevé du milieu, l'absence totale de RNase HI nous donne une petite fenêtre avant la mort cellulaire pour tester notre hypothèse. Cependant, l'ADN dans ce triple mutant est très relaxé et on n'aperçoit donc pas d'hypersurenroulement négatif. Nous savons pourtant que la présence d'hypersurenroulement négatif est reliée à la production d'ARN incomplets. Dans ce triple mutant, l'ARN de *fis* est en effet de pleine longueur (Usongo et al., 2008). Nous ne sommes donc pas en mesure de tester notre hypothèse avec le triple mutant *topA gyrB(Ts) rnhA*.

Le fait que l'ARN ne soit pas dégradé quand l'ADN est dans un état relaxé, supporte assez bien l'idée que l'hypersurenroulement négatif est impliqué dans la production d'ARN incomplets. Pour tester notre hypothèse avec ce modèle, il faudrait éliminer la relaxation de l'ADN dans le triple mutant. Il s'agirait d'identifier les facteurs impliqués dans la relaxation de l'ADN et de les inactiver afin de permettre à l'ADN de redevenir hypersurenroulé

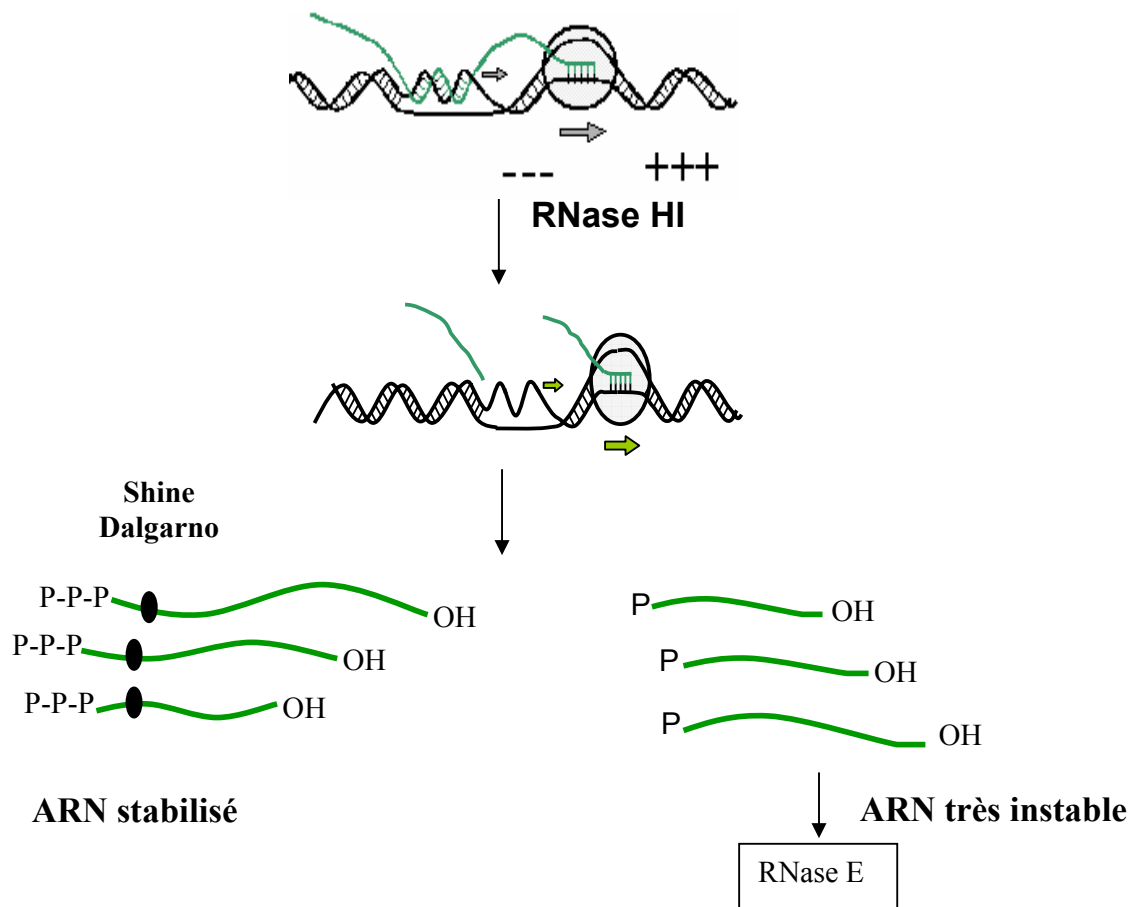


Figure 6 : Modèle de la production d'ARN courts par la RNase HI. Le clivage de l'ARN d'un R-loop par la RNase HI génère un bout d'ARN avec une extrémité 3' hydroxyle (OH) et un autre bout d'ARN avec une extrémité 5' monophosphate (P). Les substrats monophosphatés sont préférés par la RNase E qui les dégrade alors très vite contrairement aux substrats triphosphorylés (P-P-P) qui sont alors stabilisés.

négativement. Nous ne pouvons donc démontrer pour l'instant que la RNase HI est responsable de la dégradation de l'ARN. Cependant, cette possibilité est soutenue par plusieurs observations. Premièrement, la RNase E qui est l'endoribonucléase majeure de la cellule, ne semble pas être impliquée dans ce processus. En effet, une mutation de cette enzyme n'empêche pas la production d'ARNm incomplets et a plutôt tendance à stabiliser aussi bien les ARNm pleine longueur que les ARNm incomplets. La dégradation de l'ARNm à donc lieu bien avant l'action de la RNase E. Deuxièmement, dans un mutant dépourvu de RNase HI, les R-loops conduisent à l'inhibition de l'expression génique sans pour autant causer la dégradation de l'ARN. Troisièmement, le lien direct entre la concentration de la RNase HI, l'accumulation d'hypersurenroulement négatif et la croissance, montre que la RNase HI joue un rôle primordial dans la production d'ARNm incomplets. Finalement, le processus de maturation normal de plusieurs ARNm polycistroniques est altéré. Les produits proximaux d'ARNm polycistroniques et leurs intermédiaires de dégradation s'accumulent, alors que les produits distaux de ces ARNm sont très vite dégradés et remplacés par une traînée visible sur gel. Un ralentissement dans la dégradation des produits en 5' de l'ARN et une accélération de ceux en 3' indiquent une implication de la RNase HI. D'après nos résultats, les R-loops formés à l'intérieur des gènes et leur dégradation par la RNase HI interféreraient avec le processus de maturation habituel de l'ARN. Leur dégradation par la RNase HI produirait aussi des ARN distaux aux extrémités monophosphatées, substrats favorisés de la RNase E. Les ARNm proximaux possédant une extrémité triphosphorylée seraient alors temporairement stabilisés puisque la RNase E serait relocalisée au niveau des nombreux ARN distaux monophosphorylés (Article 1).

V. CONCLUSION

Dans le mutant *topA gyrB(Ts)*, les ribosomes sont fonctionnels malgré un défaut dans la synthèse des ARN ribosomiaux. Une défectuosité des ribosomes ne peut donc pas expliquer l'inhibition de la synthèse protéique dans notre mutant. Par contre, l'accumulation d'ARNm incomplets et traductibles au profit d'ARNm de pleine longueur semble être responsable de l'altération du profil protéique de la cellule. Un défaut important dans la synthèse protéique serait en mesure de ralentir et même d'arrêter la croissance bactérienne.

La présence et l'accumulation d'hypersurenroulement corrèle parfaitement avec l'inhibition de la croissance et son accumulation est inhibée par la surproduction de la RNase HI. Dans un état hypersurenroulé négativement, la séparation considérable des brins d'ADN favorise la formation de nombreux R-loops non spécifiques (indépendants de la richesse en bases GC). La surproduction de la RNase HI a donc pour effet d'empêcher cette accumulation d'hypersurenroulement négatif ce qui prévient alors la formation de nombreux R-loops. Comme la présence d'hypersurenroulement négatif corrèle parfaitement avec la croissance, son accumulation est alors associée à la production d'ARNm incomplets. La seule activité connue de la RNase HI est la dégradation de l'ARN d'un hybride ARN/ADN. Dans ces conditions, l'effet de la RNase HI sur l'hypersurenroulement négatif est intimement lié à l'élimination des R-loops par cette enzyme. C'est donc en supprimant très rapidement les premiers R-loops formés que les molécules de RNase HI en excès ont un effet sur l'accumulation d'hypersurenroulement négatif. Cela suggère que la présence de R-loops relativement stables contribue à l'accumulation d'hypersurenroulement négatif selon le modèle du « R-loop self promoting cycle » (Drolet, 2006). Quand la RNase HI est présente en faible quantité, son action distributive contribuerait à la stabilité relative des R-loops. Nos travaux sur le lien entre l'hypersurenroulement négatif et la formation de R-loops, ainsi que ceux de la surproduction de la RNase HI sur l'accumulation du surenroulement négatif et sur croissance, supportent assez bien ce modèle.

Selon le modèle du « R-loop self promoting cycle », la dégradation de l'ARN des R-loops par la RNase HI favoriserait la diffusion et l'accumulation de surenroulement négatif. Les expériences de stabilité de l'ARN montrent que des ARNm de pleine longueur sont synthétisés mais très vite dégradés. Ceci exclut la possibilité que les ARNm incomplets soient issus de blocages transcriptionnels engendrés par des R-loops, sinon les ARNm de pleine

longueur ne seraient pas synthétisés. De plus, aucunes preuves de blocages transcriptionnels dans le mutant *topA* n'ont encore été fournies. Par ailleurs, les évidences que de tels événements puissent avoir lieu *in vivo* sont faibles. Le mécanisme par lequel l'ARNm pleine longueur est dégradé n'a pas encore été élucidé. Cependant, de nombreuses évidences montrent que la RNase HI est l'élément principal dans ce processus.

Avant nos travaux, aucune étude n'avait encore décrit les effets des R-loops sur l'expression génique. Nous avons démontré que la formation de R-loops en l'absence de topoisomérase I était responsable de l'inhibition de l'expression génique. Nous montrons aussi pour la première fois que dans le mutant *rnhA*, la formation des R-loops stables est responsable d'une diminution de l'expression génique, particulièrement suite à l'exposition à un stress (Article 2). Contrairement à un mutant *topA*, les R-loops dans le mutant *rnhA* ne conduisent pas à la dégradation de l'ARN. On peut donc citer deux effets nouveaux des R-loops sur l'expression génique. En absence de topoisomérase I et en présence de RNase HI, la formation de R-loops conduit à l'accumulation d'hypersurenroulement négatif ce qui a pour conséquence la dégradation de l'ARN et l'inhibition de l'expression génique. En l'absence de RNase HI et en présence de topoisomérase I, la formation de R-loops mène à une diminution de l'expression génique. Dans les deux cas, les R-loops sont à l'origine de l'inhibition de l'expression génique qui affecte négativement la croissance.

Une des conséquences importantes de la formation de R-loops est la modification du surenroulement de l'ADN. En absence de topoisomérase I, il y a une accumulation d'hypersurenroulement négatif qui a tendance à diminuer au moment où la croissance reprend. Lorsque la topoisomérase I et la RNase HI sont toutes deux inactivées, l'ADN est alors excessivement relaxé ce qui affecte la viabilité des cellules. Il apparaît donc que la réponse cellulaire à la formation de R-loops est la relaxation du surenroulement négatif. Quand l'ADN est très relaxé, il pourrait y avoir de nombreuses conséquences sur les fonctions de l'ADN et sur les différentes activités cellulaires (Introduction, sections 3 et 4). Dans le double mutant *topA rnhA*, les cellules « filamentent » et possèdent un problème de ségrégation des chromosomes après la réplication (Usongo et *al.*, 2008). Or, il a été démontré que le surenroulement négatif de l'ADN est important pour le processus de division cellulaire (Sawitzke et Austin, 2000). Dans le mutant *rnhA*, la réponse cellulaire à la formation de R-loops pourrait aussi induire la relaxation du surenroulement négatif au-delà du seuil moyen, ce qui réduirait le taux d'initiation de la transcription et diminuerait par conséquent

l'expression génique (Introduction, section 4). En réduisant ainsi le taux d'initiation, cela diminuerait considérablement le nombre de R-loops susceptibles de se former sinon cela pourrait conduire à l'accumulation d'hypersurenroulement négatif (Drolet 2006).

Pourquoi la cellule relaxe-t-elle son surenroulement négatif en réponse à la formation de R-loop ? L'ADN simple brin possède une sensibilité plus importante que l'ADN double brin aux modifications chimiques. L'accumulation de surenroulement négatif qui facilite une plus grande séparation des brins d'ADN, peut alors favoriser des mutations dans l'ADN (Aguilera, 2002). Un R-loop fournit également un ADN simple brin stable, ce qui faciliterait l'apparition de mutations dans l'ADN. L'accumulation d'hypersurenroulement par la formation des R-loops ne fait qu'augmenter la présence d'ADN simple brin. C'est donc dans le but de préserver l'intégrité de son ADN que la cellule doit absolument relaxer le surenroulement négatif suite à la formation de R-loops. Cette réponse limite alors la formation de R-loops, l'accumulation d'hypersurenroulement négatif et les effets négatifs des R-loops. Ceci supporte fortement le rôle du surenroulement négatif dans le mécanisme de formation des R-loops.

La régulation du surenroulement par les différentes topoisomérases de la cellule est une tâche essentielle. Elle permet de maintenir le surenroulement de l'ADN autour d'une moyenne qui préserve son intégrité et qui est favorable à l'ensemble des activités génomiques. La topoisomérase I joue un rôle majeur dans ce processus. En relaxant le surenroulement négatif, elle prévient les conséquences négatives de son accumulation. En absence de topoisomérase I, cette régulation du surenroulement négatif se manifeste toujours. Il serait intéressant d'identifier le(s) facteur(s) secondaire(s) impliqué(s) dans cette régulation. Ceci nous permettrait d'avoir une meilleure idée des nombreuses possibilités dont dispose la cellule pour réguler le niveau de surenroulement de l'ADN, et de mieux comprendre comment la cellule intervient pour contrôler la formation des R-loops.

VI. RÉFÉRENCES

- Adams DE, Shekhtman EM, Zechiedrich EL, Schmid MB, Cozzarelli NR (1992) The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* **71**, 277-88.
- Aguilera A (2002) The connection between transcription and genomic instability. *EMBO J* **21**, 195-201.
- Albert AC, Spirito F, Figueroa-Bossi N, Bossi L, Rahmouni AR (1996) Hyper-negative template DNA supercoiling during transcription of the tetracycline-resistance gene in topA mutants is largely constrained in vivo. *Nucleic Acids Res* **24**, 3093-9.
- Alexandrov AI, Cozzarelli NR, Holmes VF, Khodursky AB, Peter BJ, Postow L, Rybenkov V, Vologodskii AV (1999) Mechanisms of separation of the complementary strands of DNA during replication. *Genetica* **106**, 131-40.
- Ali Azam T, Iwata A, Nishimura A, Ueda S, Ishihama A (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the Escherichia coli nucleoid. *J Bacteriol* **181**, 6361-70.
- Ali BM, Amit R, Braslavsky I, Oppenheim AB, Gileadi O, Stavans J (2001) Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10658-63.
- Altman S (2007) A view of RNase P. *Mol Biosyst* **3**, 604-7.
- Artsimovitch I, Landick R (2000) Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7090-5.
- Aussel L, Barre FX, Aroyo M, Stasiak A, Stasiak AZ, Sherratt D (2002) FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* **108**, 195-205.
- Azam TA, Hiraga S, Ishihama A (2000) Two types of localization of the DNA-binding proteins within the Escherichia coli nucleoid. *Genes Cells* **5**, 613-26.
- Azam TA, Ishihama A (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from Escherichia coli. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* **274**, 33105-13.
- Baaklini I, Hraiky C, Rallu F, Tse-Dinh YC, Drolet M (2004) RNase HI overproduction is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **54**, 198-211.
- Baker TA, Kornberg A (1988) Transcriptional activation of initiation of replication from the E. coli chromosomal origin: an RNA-DNA hybrid near oriC. *Cell* **55**, 113-23.
- Baker TA, Wickner SH (1992) Genetics and enzymology of DNA replication in Escherichia coli. *Annu Rev Genet* **26**, 447-77.

- Balke VL, Gralla JD (1987) Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 4499-506.
- Ball CA, Osuna R, Ferguson KC, Johnson RC (1992) Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 8043-56.
- Balzer M, Wagner R (1998) Mutations in the leader region of ribosomal RNA operons cause structurally defective 30 S ribosomes as revealed by in vivo structural probing. *J Mol Biol* **276**, 547-57.
- Barre FX, Soballe B, Michel B, Aroyo M, Robertson M, Sherratt D (2001) Circles: the replication-recombination-chromosome segregation connection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8189-95.
- Bates AD, Maxwell A (1993) DNA topology. Oxford University Press.
- Beale RC, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Harris RS, Rada C, Neuberger MS (2004) Comparison of the differential context-dependence of DNA deamination by APOBEC enzymes: correlation with mutation spectra in vivo. *J Mol Biol* **337**, 585-96.
- Beloin C, Jeusset J, Revet B, Mirambeau G, Le Hegarat F, Le Cam E (2003) Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J Biol Chem* **278**, 5333-42.
- Benham CJ, Mielke SP (2005) DNA mechanics. *Annu Rev Biomed Eng* **7**, 21-53.
- Bennett JL, Jeong-Yu S, Clayton DA (1992) Characterization of a *Xenopus laevis* ribonucleoprotein endoribonuclease. Isolation of the RNA component and its expression during development. *J Biol Chem* **267**, 21765-72.
- Bensaid A, Almeida A, Drlica K, Rouviere-Yaniv J (1996) Cross-talk between topoisomerase I and HU in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **256**, 292-300.
- Bentin T, Cherny D, Larsen HJ, Nielsen PE (2005) Transcription arrest caused by long nascent RNA chains. *Biochim Biophys Acta* **1727**, 97-105.
- Bentin T, Nielsen PE (2002) In vitro transcription of a torsionally constrained template. *Nucleic Acids Res* **30**, 803-9.
- Berg KL, Squires C, Squires CL (1989) Ribosomal RNA operon anti-termination. Function of leader and spacer region box B-box A sequences and their conservation in diverse micro-organisms. *J Mol Biol* **209**, 345-58.
- Besancon W, Wagner R (1999) Characterization of transient RNA-RNA interactions important for the facilitated structure formation of bacterial ribosomal 16S RNA. *Nucleic Acids Res* **27**, 4353-62.
- Blakely GW, Murray NE (2006) Control of the endonuclease activity of type I restriction-modification systems is required to maintain chromosome integrity following homologous recombination. *Mol Microbiol* **60**, 883-93.

- Bliska JB, Cozzarelli NR (1987) Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism in vivo. *J Mol Biol* **194**, 205-18.
- Borukhov S, Sagitov V, Goldfarb A (1993) Transcript cleavage factors from E. coli. *Cell* **72**, 459-66.
- Botchan P, Wang JC, Echols H (1973) Effect of circularity and superhelicity on transcription from bacteriophage lambda DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3077-81.
- Bram RJ, Young RA, Steitz JA (1980) The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of E. coli. *Cell* **19**, 393-401.
- Brent R, Ptashne M (1981) Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4204-8.
- Britton RA, Lin DC, Grossman AD (1998) Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev* **12**, 1254-9.
- Broccoli S, Phoenix P, Drolet M (2000) Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **35**, 58-68.
- Brown PO, Cozzarelli NR (1981) Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 843-7.
- Brown PO, Peebles CL, Cozzarelli NR (1979) A topoisomerase from Escherichia coli related to DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 6110-4.
- Bubunencko M, Baker T, Court DL (2007) Essentiality of ribosomal and transcription antitermination proteins analyzed by systematic gene replacement in Escherichia coli. *J Bacteriol* **189**, 2844-53.
- Camps M, Loeb LA (2005) Critical role of R-loops in processing replication blocks. *Front Biosci* **10**, 689-98.
- Cao Y, Kogoma T (1993) Requirement for the polymerization and 5'→3' exonuclease activities of DNA polymerase I in initiation of DNA replication at *oriK* sites in the absence of RecA in Escherichia coli *rnhA* mutants. *J Bacteriol* **175**, 7254-9.
- Capiaux H, Lesterlin C, Peralis K, Louarn JM, Cornet F (2002) A dual role for the FtsK protein in Escherichia coli chromosome segregation. *EMBO Rep* **3**, 532-6.
- Carpousis AJ (2007) The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol* **61**, 71-87.
- Case RB, Chang YP, Smith SB, Gore J, Cozzarelli NR, Bustamante C (2004) The bacterial condensin MukBEF compacts DNA into a repetitive, stable structure. *Science* **305**, 222-7.

- Celesnik H, Deana A, Belasco JG (2007) Initiation of RNA decay in Escherichia coli by 5' pyrophosphate removal. *Mol Cell* **27**, 79-90.
- Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**, 369-413.
- Champoux JJ (2002) Type IA DNA topoisomerases: strictly one step at a time. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11998-2000.
- Chang DD, Clayton DA (1985) Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 351-5.
- Chang DD, Hauswirth WW, Clayton DA (1985) Replication priming and transcription initiate from precisely the same site in mouse mitochondrial DNA. *EMBO J* **4**, 1559-67.
- Chaudhuri J, Basu U, *et al.* (2007) Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol* **94**, 157-214.
- Chaudhuri J, Tian M, Khuong C, Chua K, Pinaud E, Alt FW (2003) Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* **422**, 726-30.
- Chavez S, Aguilera A (1997) The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev* **11**, 3459-70.
- Chavez S, Beilharz T, Rondon AG, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ, Lithgow T, Aguilera A (2000) A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**, 5824-34.
- Cheng B, Rui S, Ji C, Gong VW, Van Dyk TK, Drolet M, Tse-Dinh YC (2003) RNase H overproduction allows the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I. *FEMS Microbiol Lett* **221**, 237-42.
- Cheng B, Zhu CX, Ji C, Ahumada A, Tse-Dinh YC (2003) Direct interaction between Escherichia coli RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **278**, 30705-10.
- Chu S, Archer RH, Zengel JM, Lindahl L (1994) The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 659-63.
- Clayton DA (1991) Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 453-78.
- Clewell DB, Evenchik BG (1973) Effects of rifampicin, streptolydigin and actinomycin D on the replication of Col E1 plasmid DNA in Escherichia coli. *J Mol Biol* **75**, 503-13.
- Coburn GA, Mackie GA (1999) Degradation of mRNA in Escherichia coli: an old problem with some new twists. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**, 55-108.

- Condon C, Squires C, Squires CL (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **59**, 623-45.
- Cook DN, Ma D, Pon NG, Hearst JE (1992) Dynamics of DNA supercoiling by transcription in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10603-7.
- Cox MM (2007) Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 127-38.
- Cozzarelli NR (1980) DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* **207**, 953-60.
- Cozzarelli NR, Wang JC (1990) DNA topology and its biological effects. Cold Spring Harbor monograph 20.
- Crisona NJ, Strick TR, Bensimon D, Croquette V, Cozzarelli NR (2000) Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev* **14**, 2881-92.
- Dairaghi DJ, Clayton DA (1993) Bovine RNase MRP cleaves the divergent bovine mitochondrial RNA sequence at the displacement-loop region. *J Mol Evol* **37**, 338-46.
- Dame RT (2005) The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol Microbiol* **56**, 858-70.
- Dame RT, Wyman C, Goosen N (2000) H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* **28**, 3504-10.
- Daniels GA, Lieber MR (1995) RNA:DNA complex formation upon transcription of immunoglobulin switch regions: implications for the mechanism and regulation of class switch recombination. *Nucleic Acids Res* **23**, 5006-11.
- Dasgupta S, Masukata H, Tomizawa J (1987) Multiple mechanisms for initiation of ColE1 DNA replication: DNA synthesis in the presence and absence of ribonuclease H. *Cell* **51**, 1113-22.
- de Massy B, Fayet O, Kogoma T (1984) Multiple origin usage for DNA replication in *sdrA(rnh)* mutants of *Escherichia coli* K-12. Initiation in the absence of *oriC*. *J Mol Biol* **178**, 227-36.
- Deana A, Celesnik H, Belasco JG (2008) The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature* **451**, 355-8.
- Delius H, Worcel A (1974) Electron microscopic studies on the folded chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **38**, 53-8.
- Delius H, Worcel A (1974) Letter: Electron microscopic visualization of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **82**, 107-9.
- Deng S, Stein RA, Higgins NP (2004) Transcription-induced barriers to supercoil diffusion in the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3398-403.

- Deng S, Stein RA, Higgins NP (2005) Organization of supercoil domains and their reorganization by transcription. *Mol Microbiol* **57**, 1511-21.
- DiGate RJ, Marians KJ (1988) Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**, 13366-73.
- DiGate RJ, Marians KJ (1989) Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli* topB, the gene encoding topoisomerase III. *J Biol Chem* **264**, 17924-30.
- DiNardo S, Voelkel KA, Sternglanz R, Reynolds AE, Wright A (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**, 43-51.
- Dorman CJ (1996) Flexible response: DNA supercoiling, transcription and bacterial adaptation to environmental stress. *Trends Microbiol* **4**, 214-6.
- Drlica K (1990) Bacterial topoisomerases and the control of DNA supercoiling. *Trends Genet* **6**, 433-7.
- Drlica K (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **6**, 425-33.
- Drolet M (2006) Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol* **59**, 723-30.
- Drolet M, Bi X, Liu LF (1994) Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation in vitro. *J Biol Chem* **269**, 2068-74.
- Drolet M, Broccoli S, Rallu F, Hraiky C, Fortin C, Masse E, Baaklini I (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci* **8**, d210-21.
- Drolet M, Phoenix P, Menzel R, Masse E, Liu LF, Crouch RJ (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta topA mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3526-30.
- Drolet M, Wu HY, Liu LF (1994) Roles of DNA topoisomerases in transcription. *Adv Pharmacol* **29A**, 135-46.
- Dunnick W, Hertz GZ, Scappino L, Gritzmacher C (1993) DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res* **21**, 365-72.
- Duquette ML, Handa P, Vincent JA, Taylor AF, Maizels N (2004) Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev* **18**, 1618-29.
- Epshtein V, Nudler E (2003) Cooperation between RNA polymerase molecules in transcription elongation. *Science* **300**, 801-5.

- Epshtein V, Toulme F, Rahmouni AR, Borukhov S, Nudler E (2003) Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation. *EMBO J* **22**, 4719-27.
- Erie DA, Hajiseyedjavadi O, Young MC, von Hippel PH (1993) Multiple RNA polymerase conformations and GreA: control of the fidelity of transcription. *Science* **262**, 867-73.
- Espeli O, Lee C, Marians KJ (2003) A physical and functional interaction between Escherichia coli FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* **278**, 44639-44.
- Espeli O, Levine C, Hassing H, Marians KJ (2003) Temporal regulation of topoisomerase IV activity in E. coli. *Mol Cell* **11**, 189-201.
- Espeli O, Marians KJ (2004) Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol* **52**, 925-31.
- Falconi M, Gualtieri MT, La Teana A, Losso MA, Pon CL (1988) Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD Escherichia coli DNA binding protein H-NS. *Mol Microbiol* **2**, 323-9.
- Fan HY, Merker RJ, Klein HL (2001) High-copy-number expression of Sub2p, a member of the RNA helicase superfamily, suppresses hpr1-mediated genomic instability. *Mol Cell Biol* **21**, 5459-70.
- Fedoroff O, Salazar M, Reid BR (1993) Structure of a DNA:RNA hybrid duplex. Why RNase H does not cleave pure RNA. *J Mol Biol* **233**, 509-23.
- Fiers W, Sinsheimer RL (1962) The structure of the DNA of bacteriophage phi-X174. I. The action of exopolynucleotidases. *J Mol Biol* **5**, 408-19.
- Filutowicz M, Jonczyk P (1981) Essential role of the gyrB gene product in the transcriptional event coupled to dnaA-dependent initiation of Escherichia coli chromosome replication. *Mol Gen Genet* **183**, 134-8.
- Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre MC (2007) Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* **89**, 427-46.
- Fugmann SD, Schatz DG (2003) Rna Aids DNA. *Nat Immunol* **4**, 429-30.
- Fukuoh A, Iwasaki H, Ishioka K, Shinagawa H (1997) ATP-dependent resolution of R-loops at the ColE1 replication origin by Escherichia coli RecG protein, a Holliday junction-specific helicase. *EMBO J* **16**, 203-9.
- Gellert M, Menzel R, Mizuuchi K, O'Dea MH, Friedman DI (1983) Regulation of DNA supercoiling in Escherichia coli. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **47 Pt 2**, 763-7.
- Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3872-6.
- Goldberg AL (1972) Correlation between rates of degradation of bacterial proteins in vivo and their sensitivity to proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2640-4.

- Gopal V, Brieba LG, Guajardo R, McAllister WT, Sousa R (1999) Characterization of structural features important for T7 RNAP elongation complex stability reveals competing complex conformations and a role for the non-template strand in RNA displacement. *J Mol Biol* **290**, 411-31.
- Gottesman S (1989) Genetics of proteolysis in *Escherichia coli**. *Annu Rev Genet* **23**, 163-98.
- Gottesman S (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **30**, 465-506.
- Gourse RL, Gaal T, Bartlett MS, Appleman JA, Ross W (1996) rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **50**, 645-77.
- Graumann PL (2001) SMC proteins in bacteria: condensation motors for chromosome segregation? *Biochimie* **83**, 53-9.
- Greive SJ, Lins AF, von Hippel PH (2005) Assembly of an RNA-protein complex. Binding of NusB and NusE (S10) proteins to boxA RNA nucleates the formation of the antitermination complex involved in controlling rRNA transcription in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**, 36397-408.
- Hammond GG, Cassidy PJ, Overbye KM (1991) Novobiocin-dependent topA deletion mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**, 5564-7.
- Hardy CD, Cozzarelli NR (2005) A genetic selection for supercoiling mutants of *Escherichia coli* reveals proteins implicated in chromosome structure. *Mol Microbiol* **57**, 1636-52.
- Harinarayanan R, Gowrishankar J (2003) Host factor titration by chromosomal R-loops as a mechanism for runaway plasmid replication in transcription termination-defective mutants of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **332**, 31-46.
- Harmon FG, DiGate RJ, Kowalczykowski SC (1999) RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell* **3**, 611-20.
- Heddle JG, Lu T, Zhao X, Drlica K, Maxwell A (2001) gyrB-225, a mutation of DNA gyrase that compensates for topoisomerase I deficiency: investigation of its low activity and quinolone hypersensitivity. *J Mol Biol* **309**, 1219-31.
- Heddle JG, Lu T, Zhao X, Drlica K, Maxwell A (2001) gyrB-225, a mutation of DNA gyrase that compensates for topoisomerase I deficiency: investigation of its low activity and quinolone hypersensitivity. *J Mol Biol* **309**, 1219-31.
- Heinrich T, Condon C, Pfeiffer T, Hartmann RK (1995) Point mutations in the leader boxA of a plasmid-encoded *Escherichia coli* rrnB operon cause defective antitermination in vivo. *J Bacteriol* **177**, 3793-800.

Hiasa H, DiGate RJ, Marians KJ (1994) Decatenating activity of Escherichia coli DNA gyrase and topoisomerases I and III during oriC and pBR322 DNA replication in vitro. *J Biol Chem* **269**, 2093-9.

Hiasa H, Marians KJ (1994) Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication. *J Biol Chem* **269**, 32655-9.

Higgins NP, Yang X, Fu Q, Roth JR (1996) Surveying a supercoil domain by using the gamma delta resolution system in Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* **178**, 2825-35.

Hirano M, Hirano T (2004) Positive and negative regulation of SMC-DNA interactions by ATP and accessory proteins. *EMBO J* **23**, 2664-73.

Hirano T (2004) Chromosome shaping by two condensins. *Cell Cycle* **3**, 26-8.

Holmes VF, Cozzarelli NR (2000) Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1322-4.

Hong X, Cadwell GW, Kogoma T (1995) Escherichia coli RecG and RecA proteins in R-loop formation. *EMBO J* **14**, 2385-92.

Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M (2002) Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* **20**, 165-96.

Hraiky C, Raymond MA, Drolet M (2000) RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in Escherichia coli. *J Biol Chem* **275**, 11257-63.

Hsieh LS, Burger RM, Drlica K (1991) Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP]. Changes associated with a transition to anaerobic growth. *J Mol Biol* **219**, 443-50.

Hsieh TJ, Farh L, Huang WM, Chan NL (2004) Structure of the topoisomerase IV C-terminal domain: a broken beta-propeller implies a role as geometry facilitator in catalysis. *J Biol Chem* **279**, 55587-93.

Hsu YH, Chung MW, Li TK (2006) Distribution of gyrase and topoisomerase IV on bacterial nucleoid: implications for nucleoid organization. *Nucleic Acids Res* **34**, 3128-38.

Huang FT, Yu K, Balter BB, Selsing E, Oruc Z, Khamlichi AA, Hsieh CL, Lieber MR (2007) Sequence dependence of chromosomal R-loops at the immunoglobulin heavy-chain Smu class switch region. *Mol Cell Biol* **27**, 5921-32.

Huang FT, Yu K, Hsieh CL, Lieber MR (2006) Downstream boundary of chromosomal R-loops at murine switch regions: implications for the mechanism of class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5030-5.

Huang L, Kim Y, Turchi JJ, Bambara RA (1994) Structure-specific cleavage of the RNA primer from Okazaki fragments by calf thymus RNase HI. *J Biol Chem* **269**, 25922-7.

- Huertas P, Aguilera A (2003) Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell* **12**, 711-21.
- Inoue N, Uchida H (1991) Transcription and initiation of ColE1 DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **173**, 1208-14.
- Iost I, Dreyfus M (1995) The stability of *Escherichia coli* lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J* **14**, 3252-61.
- Itaya M (1990) Isolation and characterization of a second RNase H (RNase HII) of *Escherichia coli* K-12 encoded by the *rnhB* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8587-91.
- Itoh T, Tomizawa J (1980) Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2450-4.
- Izban MG, Luse DS (1991) Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev* **5**, 683-96.
- Jafri S, Evoy S, Cho K, Craighead HG, Winans SC (1999) An Lrp-type transcriptional regulator from *Agrobacterium tumefaciens* condenses more than 100 nucleotides of DNA into globular nucleoprotein complexes. *J Mol Biol* **288**, 811-24.
- Jimeno S, Rondon AG, Luna R, Aguilera A (2002) The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO J* **21**, 3526-35.
- Kaczanowska M, Ryden-Aulin M (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 477-94.
- Kaguni JM, Bertsch LL, *et al.* (1985) Initiation of replication of the *Escherichia coli* chromosomal origin reconstituted with purified enzymes. *Basic Life Sci* **30**, 141-50.
- Kampranis SC, Maxwell A (1996) Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14416-21.
- Kanaya S, Crouch RJ (1983) DNA sequence of the gene coding for *Escherichia coli* ribonuclease H. *J Biol Chem* **258**, 1276-81.
- Kano Y, Imamoto F (1990) Requirement of integration host factor (IHF) for growth of *Escherichia coli* deficient in HU protein. *Gene* **89**, 133-7.
- Kar S, Choi EJ, Guo F, Dimitriadis EK, Kotova SL, Adhya S (2006) Right-handed DNA supercoiling by an octameric form of histone-like protein HU: modulation of cellular transcription. *J Biol Chem* **281**, 40144-53.
- Kar S, Edgar R, Adhya S (2005) Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16397-402.

- Karem K, Foster JW (1993) The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **10**, 75-86.
- Kasahara M, Clikeman JA, Bates DB, Kogoma T (2000) RecA protein-dependent R-loop formation in vitro. *Genes Dev* **14**, 360-5.
- Kasamatsu H, Vinograd J (1974) Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **43**, 695-719.
- Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **63**, 393-404.
- Kato J, Suzuki H, Ikeda H (1992) Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 25676-84.
- Kavenoff R, Bowen BC (1976) Electron microscopy of membrane-free folded chromosomes from *Escherichia coli*. *Chromosoma* **59**, 89-101.
- Keller W, Crouch R (1972) Degradation of DNA RNA hybrids by ribonuclease H and DNA polymerases of cellular and viral origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 3360-4.
- Khodursky AB, Peter BJ, Schmid MB, DeRisi J, Botstein D, Brown PO, Cozzarelli NR (2000) Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9419-24.
- Kinoshita K, Honjo T (2000) Unique and unprecedented recombination mechanisms in class switching. *Curr Opin Immunol* **12**, 195-8.
- Kirkegaard K, Wang JC (1985) Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J Mol Biol* **185**, 625-37.
- Kogoma T (1978) A novel *Escherichia coli* mutant capable of DNA replication in the absence of protein synthesis. *J Mol Biol* **121**, 55-69.
- Kogoma T (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 212-38.
- Kogoma T, Barnard KG, Hong X (1994) RecA, Tus protein and constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli* *rnhA* mutants. *Mol Gen Genet* **244**, 557-62.
- Kogoma T, Hong X, Cadwell GW, Barnard KG, Asai T (1993) Requirement of homologous recombination functions for viability of the *Escherichia coli* cell that lacks RNase HI and exonuclease V activities. *Biochimie* **75**, 89-99.
- Kogoma T, Maldonado RR (1997) DNA polymerase I in constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 2109-15.
- Kogoma T, Skarstad K, Boye E, von Meyenburg K, Steen HB (1985) RecA protein acts at the initiation of stable DNA replication in *rnh* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **163**, 439-44.

- Kogoma T, Subia NL, von Meyenburg K (1985) Function of ribonuclease H in initiation of DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **200**, 103-9.
- Komissarova N, Kashlev M (1997) RNA polymerase switches between inactivated and activated states by translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem* **272**, 15329-38.
- Komissarova N, Kashlev M (1997) Transcriptional arrest: *Escherichia coli* RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1755-60.
- Korzheva N, Mustaev A (2001) Transcription elongation complex: structure and function. *Curr Opin Microbiol* **4**, 119-25.
- Krasilnikov AS, Podtelezhnikov A, Vologodskii A, Mirkin SM (1999) Large-scale effects of transcriptional DNA supercoiling in vivo. *J Mol Biol* **292**, 1149-60.
- Kreuzer KN, Cozzarelli NR (1979) *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J Bacteriol* **140**, 424-35.
- Kwan KY, Moens PB, Wang JC (2003) Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase III beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2526-31.
- Kwan KY, Wang JC (2001) Mice lacking DNA topoisomerase IIIbeta develop to maturity but show a reduced mean lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5717-21.
- Landick R (2006) The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. *Biochem Soc Trans* **34**, 1062-6.
- Lasken RS, Kornberg A (1988) The primosomal protein n' of *Escherichia coli* is a DNA helicase. *J Biol Chem* **263**, 5512-8.
- Lee DY, Clayton DA (1997) RNase mitochondrial RNA processing correctly cleaves a novel R loop at the mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. *Genes Dev* **11**, 582-92.
- Lee DY, Clayton DA (1998) Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. *J Biol Chem* **273**, 30614-21.
- Lee K, Bernstein JA, Cohen SN (2002) RNase G complementation of rne null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **43**, 1445-56.
- Lee MS, Marians KJ (1987) *Escherichia coli* replication factor Y, a component of the primosome, can act as a DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8345-9.
- Lesley SA, Jovanovich SB, Tse-Dinh YC, Burgess RR (1990) Identification of a heat shock promoter in the topA gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 6871-4.

- Lesterlin C, Barre FX, Cornet F (2004) Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. *Mol Microbiol* **54**, 1151-60.
- Li K, Smagula CS, Parsons WJ, Richardson JA, Gonzalez M, Hagler HK, Williams RS (1994) Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis. *J Cell Biol* **124**, 871-82.
- Li SC, Squires CL, Squires C (1984) Antitermination of E. coli rRNA transcription is caused by a control region segment containing lambda nut-like sequences. *Cell* **38**, 851-60.
- Li W, Wang JC (1998) Mammalian DNA topoisomerase IIIalpha is essential in early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1010-3.
- Li X, Wang J, Manley JL (2005) Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes Dev* **19**, 2705-14.
- Li Y, Altman S (2004) In search of RNase P RNA from microbial genomes. *RNA* **10**, 1533-40.
- Li Z, Deutscher MP (1995) The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6883-6.
- Li Z, Pandit S, Deutscher MP (1999) RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J* **18**, 2878-85.
- Liiv A, Remme J (2004) Importance of transient structures during post-transcriptional refolding of the pre-23S rRNA and ribosomal large subunit assembly. *J Mol Biol* **342**, 725-41.
- Lim HM, Lewis DE, Lee HJ, Liu M, Adhya S (2003) Effect of varying the supercoiling of DNA on transcription and its regulation. *Biochemistry* **42**, 10718-25.
- Lima WF, Crooke ST (1997) Binding affinity and specificity of Escherichia coli RNase H1: impact on the kinetics of catalysis of antisense oligonucleotide-RNA hybrids. *Biochemistry* **36**, 390-8.
- Lima WF, Crooke ST (1997) Cleavage of single strand RNA adjacent to RNA-DNA duplex regions by Escherichia coli RNase H1. *J Biol Chem* **272**, 27513-6.
- Little JW (1991) Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie* **73**, 411-21.
- Little JW (1993) LexA cleavage and other self-processing reactions. *J Bacteriol* **175**, 4943-50.
- Little JW, Mount DW, Yanisch-Perron CR (1981) Purified lexA protein is a repressor of the recA and lexA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4199-203.
- Liu LF, Wang JC (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7024-7.

- Lloyd RG, Buckman C (1991) Genetic analysis of the recG locus of Escherichia coli K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *J Bacteriol* **173**, 1004-11.
- Lloyd RG, Sharples GJ (1993) Dissociation of synthetic Holliday junctions by E. coli RecG protein. *EMBO J* **12**, 17-22.
- Lloyd RG, Sharples GJ (1993) Processing of recombination intermediates by the RecG and RuvAB proteins of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* **21**, 1719-25.
- Lodge JK, Kazic T, Berg DE (1989) Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J Bacteriol* **171**, 2181-7.
- Lopez CR, Yang S, Deibler RW, Ray SA, Pennington JM, Digate RJ, Hastings PJ, Rosenberg SM, Zechiedrich EL (2005) A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol Microbiol* **58**, 80-101.
- Lopez PJ, Marchand I, Yarchuk O, Dreyfus M (1998) Translation inhibitors stabilize Escherichia coli mRNAs independently of ribosome protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6067-72.
- Lopez-Garcia P (1999) DNA supercoiling and temperature adaptation: A clue to early diversification of life? *J Mol Evol* **49**, 439-52.
- Lopez-Garcia P, Forterre P (1999) Control of DNA topology during thermal stress in hyperthermophilic archaea: DNA topoisomerase levels, activities and induced thermotolerance during heat and cold shock in Sulfolobus. *Mol Microbiol* **33**, 766-77.
- Losada A, Hirano T (2005) Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* **19**, 1269-87.
- Luby TM, Schrader CE, Stavnezer J, Selsing E (2001) The mu switch region tandem repeats are important, but not required, for antibody class switch recombination. *J Exp Med* **193**, 159-68.
- Luijsterburg MS, Noom MC, Wuite GJ, Dame RT (2006) The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J Struct Biol* **156**, 262-72.
- Lygerou Z, Allmang C, Tollervey D, Seraphin B (1996) Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science* **272**, 268-70.
- Lynch AS, Wang JC (1993) Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J Bacteriol* **175**, 1645-55.
- Ma D, Cook DN, Pon NG, Hearst JE (1994) Efficient anchoring of RNA polymerase in Escherichia coli during coupled transcription-translation of genes encoding integral inner membrane polypeptides. *J Biol Chem* **269**, 15362-70.

- Mackie GA (1998) Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**, 720-3.
- Mackie GA (2000) Stabilization of circular rpsT mRNA demonstrates the 5'-end dependence of RNase E action in vivo. *J Biol Chem* **275**, 25069-72.
- Makovets S, Doronina VA, Murray NE (1999) Regulation of endonuclease activity by proteolysis prevents breakage of unmodified bacterial chromosomes by type I restriction enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9757-62.
- Malik M, Bensaid A, Rouviere-Yaniv J, Drlica K (1996) Histone-like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *J Mol Biol* **256**, 66-76.
- Manis JP, Tian M, Alt FW (2002) Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* **23**, 31-9.
- Marians KJ (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* **61**, 673-719.
- Masai H, Asai T, Kubota Y, Arai K, Kogoma T (1994) Escherichia coli PriA protein is essential for inducible and constitutive stable DNA replication. *EMBO J* **13**, 5338-45.
- Masse E, Drolet M (1999a) Escherichia coli DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem* **274**, 16659-64.
- Masse E, Drolet M (1999b) Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of Escherichia coli DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **274**, 16654-8.
- Masse E, Drolet M (1999c) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in Escherichia coli topA mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol* **294**, 321-32.
- Masse E, Phoenix P, Drolet M (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the rrnB operon in Escherichia coli. *J Biol Chem* **272**, 12816-23.
- Massey TH, Aussel L, Barre FX, Sherratt DJ (2004) Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. *EMBO Rep* **5**, 399-404.
- Masukata H, Dasgupta S, Tomizawa J (1987) Transcriptional activation of ColE1 DNA synthesis by displacement of the nontranscribed strand. *Cell* **51**, 1123-30.
- McCool JD, Long E, Petrosino JF, Sandler HA, Rosenberg SM, Sandler SJ (2004) Measurement of SOS expression in individual Escherichia coli K-12 cells using fluorescence microscopy. *Mol Microbiol* **53**, 1343-57.
- Meiklejohn AL, Gralla JD (1989) Activation of the lac promoter and its variants. Synergistic effects of catabolite activator protein and supercoiling in vitro. *J Mol Biol* **207**, 661-73.
- Menzel R, Gellert M (1983) Regulation of the genes for E. coli DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* **34**, 105-13.

- Menzel R, Gellert M (1987) Modulation of transcription by DNA supercoiling: a deletion analysis of the Escherichia coli gyrA and gyrB promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 4185-9.
- Mizuuchi K, Fisher LM, O'Dea MH, Gellert M (1980) DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1847-51.
- Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-63.
- Murante RS, Henricksen LA, Bambara RA (1998) Junction ribonuclease: an activity in Okazaki fragment processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2244-9.
- Murli S, Opperman T, Smith BT, Walker GC (2000) A role for the umuDC gene products of Escherichia coli in increasing resistance to DNA damage in stationary phase by inhibiting the transition to exponential growth. *J Bacteriol* **182**, 1127-35.
- Muskhelishvili G, Travers A (2003) Transcription factor as a topological homeostat. *Front Biosci* **8**, d279-85.
- Naito S, Kitani T, Ogawa T, Okazaki T, Uchida H (1984) Escherichia coli mutants suppressing replication-defective mutations of the ColE1 plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 550-4.
- Naito S, Uchida H (1986) RNase H and replication of ColE1 DNA in Escherichia coli. *J Bacteriol* **166**, 143-7.
- Nakamura H, Oda Y, *et al.* (1991) How does RNase H recognize a DNA.RNA hybrid? *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11535-9.
- Nasmyth K, Haering CH (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* **74**, 595-648.
- Niu DK (2007) Protecting exons from deleterious R-loops: a potential advantage of having introns. *Biol Direct* **2**, 11.
- Nudler E, Mustaev A, Lukhtanov E, Goldfarb A (1997) The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell* **89**, 33-41.
- Nurse P, Levine C, Hassing H, Mariani KJ (2003) Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in Escherichia coli. *J Biol Chem* **278**, 8653-60.
- Oakley TJ, Hickson ID (2002) Defending genome integrity during S-phase: putative roles for RecQ helicases and topoisomerase III. *DNA Repair (Amst)* **1**, 175-207.
- Ogata Y, Mizushima T, Kataoka K, Kita K, Miki T, Sekimizu K (1996) DnaK heat shock protein of Escherichia coli maintains the negative supercoiling of DNA against thermal stress. *J Biol Chem* **271**, 29407-14.

- Ogawa T, Okazaki T (1984) Function of RNase H in DNA replication revealed by RNase H defective mutants of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **193**, 231-7.
- Ohsato T, Muta T, Fukuoh A, Shinagawa H, Hamasaki N, Kang D (1999) R-Loop in the replication origin of human mitochondrial DNA is resolved by RecG, a Holliday junction-specific helicase. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 1-5.
- Ohtani N, Haruki M, Morikawa M, Crouch RJ, Itaya M, Kanaya S (1999) Identification of the genes encoding Mn²⁺-dependent RNase HII and Mg²⁺-dependent RNase HIII from *Bacillus subtilis*: classification of RNases H into three families. *Biochemistry* **38**, 605-18.
- Okazaki IM, Kinoshita K, Muramatsu M, Yoshikawa K, Honjo T (2002) The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature* **416**, 340-5.
- Okazaki R, Sugimoto K, Okazaki T, Imae Y, Sugino A (1970) DNA chain growth: in vivo and in vitro synthesis in a DNA polymerase-negative mutant of *E. coli*. *Nature* **228**, 223-6.
- Olavarrieta L, Hernandez P, Krimer DB, Schvartzman JB (2002) DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *J Mol Biol* **322**, 1-6.
- Ow MC, Perwez T, Kushner SR (2003) RNase G of *Escherichia coli* exhibits only limited functional overlap with its essential homologue, RNase E. *Mol Microbiol* **49**, 607-22.
- Paluh JL, Clayton DA (1995) *Schizosaccharomyces pombe* RNase MRP RNA is homologous to metazoan RNase MRP RNAs and may provide clues to interrelationships between RNase MRP and RNase P. *Yeast* **11**, 1249-64.
- Pan CQ, Finkel SE, Cramton SE, Feng JA, Sigman DS, Johnson RC (1996) Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts. *J Mol Biol* **264**, 675-95.
- Pardon B, Wagner R (1995) The *Escherichia coli* ribosomal RNA leader nut region interacts specifically with mature 16S RNA. *Nucleic Acids Res* **23**, 932-41.
- Paul BJ, Barker MM, Ross W, Schneider DA, Webb C, Foster JW, Gourse RL (2004) DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* **118**, 311-22.
- Paull TT, Johnson RC (1995) DNA looping by *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins NHP6A/B. Consequences for nucleoprotein complex assembly and chromatin condensation. *J Biol Chem* **270**, 8744-54.
- Pavco PA, Steege DA (1990) Elongation by *Escherichia coli* RNA polymerase is blocked in vitro by a site-specific DNA binding protein. *J Biol Chem* **265**, 9960-9.
- Pease PJ, Levy O, Cost GJ, Gore J, Ptacin JL, Sherratt D, Bustamante C, Cozzarelli NR (2005) Sequence-directed DNA translocation by purified FtsK. *Science* **307**, 586-90.

- Peng H, Marians KJ (1993) Decatenation activity of topoisomerase IV during oriC and pBR322 DNA replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8571-5.
- Peng H, Marians KJ (1993) Escherichia coli topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem* **268**, 24481-90.
- Peter BJ, Arsuaga J, Breier AM, Khodursky AB, Brown PO, Cozzarelli NR (2004) Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in Escherichia coli. *Genome Biol* **5**, R87.
- Pfeiffer T, Hartmann RK (1997) Role of the spacer boxA of Escherichia coli ribosomal RNA operons in efficient 23 S rRNA synthesis in vivo. *J Mol Biol* **265**, 385-93.
- Pham P, Bransteitter R, Petruska J, Goodman MF (2003) Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* **424**, 103-7.
- Pham P, Seitz EM, Saveliev S, Shen X, Woodgate R, Cox MM, Goodman MF (2002) Two distinct modes of RecA action are required for DNA polymerase V-catalyzed translesion synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11061-6.
- Phoenix P, Raymond MA, Masse E, Drolet M (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation in vitro. *J Biol Chem* **272**, 1473-9.
- Piruat JI, Aguilera A (1998) A novel yeast gene, THO2, is involved in RNA pol II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination. *EMBO J* **17**, 4859-72.
- Postow L, Crisona NJ, Peter BJ, Hardy CD, Cozzarelli NR (2001) Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8219-26.
- Postow L, Hardy CD, Arsuaga J, Cozzarelli NR (2004) Topological domain structure of the Escherichia coli chromosome. *Genes Dev* **18**, 1766-79.
- Postow L, Peter BJ, Cozzarelli NR (1999) Knot what we thought before: the twisted story of replication. *Bioessays* **21**, 805-8.
- Prado F, Piruat JI, Aguilera A (1997) Recombination between DNA repeats in yeast hpr1delta cells is linked to transcription elongation. *EMBO J* **16**, 2826-35.
- Pruss GJ, Drlica K (1986) Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8952-6.
- Pruss GJ, Manes SH, Drlica K (1982) Escherichia coli DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**, 35-42.
- Qi H, Menzel R, Tse-Dinh YC (1996) Effect of the deletion of the sigma 32-dependent promoter (P1) of the Escherichia coli topoisomerase I gene on thermotolerance. *Mol Microbiol* **21**, 703-11.

- Qi H, Menzel R, Tse-Dinh YC (1997) Regulation of Escherichia coli topA gene transcription: involvement of a sigmaS-dependent promoter. *J Mol Biol* **267**, 481-9.
- Qi H, Menzel R, Tse-Dinh YC (1999) Increased thermosensitivity associated with topoisomerase I deletion and promoter mutations in Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* **178**, 141-6.
- Rahmouni AR, Wells RD (1992) Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling in vivo. *J Mol Biol* **223**, 131-44.
- Ramiro AR, Stavropoulos P, Jankovic M, Nussenzweig MC (2003) Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat Immunol* **4**, 452-6.
- Reaban ME, Griffin JA (1990) Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. *Nature* **348**, 342-4.
- Reaban ME, Lebowitz J, Griffin JA (1994) Transcription induces the formation of a stable RNA.DNA hybrid in the immunoglobulin alpha switch region. *J Biol Chem* **269**, 21850-7.
- Reines D, Ghanouni P, Gu W, Mote J, Jr., Powell W (1993) Transcription elongation by RNA polymerase II: mechanism of SII activation. *Cell Mol Biol Res* **39**, 331-8.
- Richardson JP (1975) Attachment of nascent RNA molecules to superhelical DNA. *J Mol Biol* **98**, 565-79.
- Richardson JP (1975) Initiation of transcription by Escherichia coli RNA polymerase from supercoiled and non-supercoiled bacteriophage PM2 DNA. *J Mol Biol* **91**, 477-87.
- Rimsky S (2004) Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Curr Opin Microbiol* **7**, 109-14.
- Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D (2003) REBASE: restriction enzymes and methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **31**, 418-20.
- Rondon AG, Jimeno S, Garcia-Rubio M, Aguilera A (2003) Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation. *J Biol Chem* **278**, 39037-43.
- Rouviere-Yaniv J, Gros F (1975) Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3428-32.
- Rui S, Tse-Dinh YC (2003) Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. *Front Biosci* **8**, d256-63.
- Sagi D, Friedman N, Vorgias C, Oppenheim AB, Stavans J (2004) Modulation of DNA conformations through the formation of alternative high-order HU-DNA complexes. *J Mol Biol* **341**, 419-28.

- Sanford JR, Longman D, Caceres JF (2003) Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Prog Mol Subcell Biol* **31**, 33-58.
- Saucier JM, Wang JC (1972) Angular alteration of the DNA helix by E. coli RNA polymerase. *Nat New Biol* **239**, 167-70.
- Sawitzke JA, Austin S (2000) Suppression of chromosome segregation defects of Escherichia coli muk mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1671-6.
- Schaferkordt J, Wagner R (2001) Effects of base change mutations within an Escherichia coli ribosomal RNA leader region on rRNA maturation and ribosome formation. *Nucleic Acids Res* **29**, 3394-403.
- Scheirer KE, Higgins NP (2001) Transcription induces a supercoil domain barrier in bacteriophage Mu. *Biochimie* **83**, 155-9.
- Schmitt ME, Clayton DA (1992) Yeast site-specific ribonucleoprotein endoribonuclease MRP contains an RNA component homologous to mammalian RNase MRP RNA and essential for cell viability. *Genes Dev* **6**, 1975-85.
- Schmitt ME, Clayton DA (1993) Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **13**, 7935-41.
- Schneider DA, Michel A, Sikes ML, Vu L, Dodd JA, Salgia S, Osheim YN, Beyer AL, Nomura M (2007) Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Mol Cell* **26**, 217-29.
- Schneider R, Travers A, Kutateladze T, Muskhelishvili G (1999) A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **34**, 953-64.
- Schofield MA, Agbunag R, Michaels ML, Miller JH (1992) Cloning and sequencing of Escherichia coli mutR shows its identity to topB, encoding topoisomerase III. *J Bacteriol* **174**, 5168-70.
- Sen D, Gilbert W (1988) Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* **334**, 364-6.
- Shadel GS, Clayton DA (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* **66**, 409-35.
- Shen HM, Storb U (2004) Activation-induced cytidine deaminase (AID) can target both DNA strands when the DNA is supercoiled. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12997-3002.
- Shlomain J, Kornberg A (1980) A prepriming DNA replication enzyme of Escherichia coli. I. Purification of protein n': a sequence-specific, DNA-dependent ATPase. *J Biol Chem* **255**, 6789-93.

- Shlomain J, Kornberg A (1980) A prepriming DNA replication enzyme of *Escherichia coli*. II. Actions of protein η' : a sequence-specific, DNA-dependent ATPase. *J Biol Chem* **255**, 6794-8.
- Sinden RR, Pettijohn DE (1981) Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 224-8.
- Slagter-Jager JG, Puzis L, Gutsell NS, Belfort M, Jain C (2007) Functional defects in transfer RNAs lead to the accumulation of ribosomal RNA precursors. *RNA* **13**, 597-605.
- Spell RM, Holm C (1994) Nature and distribution of chromosomal intertwinings in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**, 1465-76.
- Spurio R, Durrenberger M, Falconi M, La Teana A, Pon CL, Gualerzi CO (1992) Lethal overproduction of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy. *Mol Gen Genet* **231**, 201-11.
- Srivatsan A, Wang JD (2008) Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr Opin Microbiol* **11**, 100-5.
- Staczek P, Higgins NP (1998) Gyrase and Topo IV modulate chromosome domain size in vivo. *Mol Microbiol* **29**, 1435-48.
- Steck TR, Drlica K (1984) Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. *Cell* **36**, 1081-8.
- Steck TR, Pruss GJ, Manes SH, Burg L, Drlica K (1984) DNA supercoiling in gyrase mutants. *J Bacteriol* **158**, 397-403.
- Stein RA, Deng S, Higgins NP (2005) Measuring chromosome dynamics on different time scales using resolvases with varying half-lives. *Mol Microbiol* **56**, 1049-61.
- Straney DC, Straney SB, Crothers DM (1989) Synergy between *Escherichia coli* CAP protein and RNA polymerase in the lac promoter open complex. *J Mol Biol* **206**, 41-57.
- Strasser K, Masuda S, *et al.* (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**, 304-8.
- Sugimoto N, Nakano S, Katoh M, Matsumura A, Nakamuta H, Ohmichi T, Yoneyama M, Sasaki M (1995) Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry* **34**, 11211-6.
- Sutton MD, Smith BT, Godoy VG, Walker GC (2000) The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu Rev Genet* **34**, 479-497.
- Tang M, Shen X, Frank EG, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman MF (1999) UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8919-24.

- Thanbichler M, Viollier PH, Shapiro L (2005) The structure and function of the bacterial chromosome. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 153-62.
- Theissen G, Thelen L, Wagner R (1993) Some base substitutions in the leader of an Escherichia coli ribosomal RNA operon affect the structure and function of ribosomes. Evidence for a transient scaffold function of the rRNA leader. *J Mol Biol* **233**, 203-18.
- Thoms B, Wackernagel W (1984) Genetic control of damage-inducible restriction alleviation in Escherichia coli K12: an SOS function not repressed by lexA. *Mol Gen Genet* **197**, 297-303.
- Torres M, Balada JM, Zellars M, Squires C, Squires CL (2004) In vivo effect of NusB and NusG on rRNA transcription antitermination. *J Bacteriol* **186**, 1304-10.
- Torres M, Condon C, Balada JM, Squires C, Squires CL (2001) Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *EMBO J* **20**, 3811-20.
- Torrey TA, Kogoma T (1982) Suppressor mutations (rin) that specifically suppress the recA⁺ dependence of stable DNA replication in Escherichia coli K-12. *Mol Gen Genet* **187**, 225-30.
- Torrey TA, Kogoma T (1987) Genetic analysis of constitutive stable DNA replication in rnh mutants of Escherichia coli K12. *Mol Gen Genet* **208**, 420-7.
- Toulme F, Mosrin-Huaman C, Sparkowski J, Das A, Leng M, Rahmouni AR (2000) GreA and GreB proteins revive backtracked RNA polymerase in vivo by promoting transcript trimming. *EMBO J* **19**, 6853-9.
- Tous C, Aguilera A (2007) Impairment of transcription elongation by R-loops in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **360**, 428-32.
- Travers A, Muskhelishvili G (2005) Bacterial chromatin. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 507-14.
- Travers A, Muskhelishvili G (2005) DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat Rev Microbiol* **3**, 157-69.
- Trucksis M, Depew RE (1981) Identification and localization of a gene that specifies production of Escherichia coli DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2164-8.
- Tse-Dinh YC (2000) Increased sensitivity to oxidative challenges associated with topA deletion in Escherichia coli. *J Bacteriol* **182**, 829-32.
- Tse-Dinh YC, Beran RK (1988) Multiple promoters for transcription of the Escherichia coli DNA topoisomerase I gene and their regulation by DNA supercoiling. *J Mol Biol* **202**, 735-42.
- Tse-Dinh YC, Qi H, Menzel R (1997) DNA supercoiling and bacterial adaptation: thermotolerance and thermoresistance. *Trends Microbiol* **5**, 323-6.

- Tupper AE, Owen-Hughes TA, Ussery DW, Santos DS, Ferguson DJ, Sidebotham JM, Hinton JC, Higgins CF (1994) The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology in vitro. *EMBO J* **13**, 258-68.
- Turchi JJ, Huang L, Murante RS, Kim Y, Bambara RA (1994) Enzymatic completion of mammalian lagging-strand DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9803-7.
- Ullsperger C, Cozzarelli NR (1996) Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**, 31549-55.
- Usongo V, Nolent F, Sanscartier P, Tanguay C, Broccoli S, Baaklini I, Drlica K, Drolet M (2008) Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation. *Mol Microbiol*.
- van Noort J, Verbrugge S, Goosen N, Dekker C, Dame RT (2004) Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6969-74.
- Varmus H (1988) Retroviruses. *Science* **240**, 1427-35.
- Viard T, de la Tour CB (2007) Type IA topoisomerases: a simple puzzle? *Biochimie* **89**, 456-67.
- Vincent SD, Mahdi AA, Lloyd RG (1996) The RecG branch migration protein of *Escherichia coli* dissociates R-loops. *J Mol Biol* **264**, 713-21.
- Vinograd J, Lebowitz J (1966) Physical and topological properties of circular DNA. *J Gen Physiol* **49**, 103-25.
- Vogel U, Jensen KF (1995) Effects of the antiterminator BoxA on transcription elongation kinetics and ppGpp inhibition of transcription elongation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 18335-40.
- Vogel U, Jensen KF (1997) NusA is required for ribosomal antitermination and for modulation of the transcription elongation rate of both antiterminated RNA and mRNA. *J Biol Chem* **272**, 12265-71.
- von Meyenburg K, Boye E, Skarstad K, Koppes L, Kogoma T (1987) Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**, 2650-8.
- Wachi M, Umitsuki G, Shimizu M, Takada A, Nagai K (1999) *Escherichia coli* cafA gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 483-8.
- Wagner R (1994) The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Arch Microbiol* **161**, 100-9.
- Walberg MW, Clayton DA (1981) Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* **9**, 5411-21.

- Walker JR, Severson KA, Hermandson MJ, Blinkova A, Carr KM, Kaguni JM (2006) Escherichia coli DnaA protein: specific biochemical defects of mutant DnaAs reduce initiation frequency to suppress a temperature-sensitive dnaX mutation. *Biochimie* **88**, 1-10.
- Wallis JW, Chrebet G, Brodsky G, Rolfe M, Rothstein R (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**, 409-19.
- Wang JC (1971) Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. *J Mol Biol* **55**, 523-33.
- Wang JC (1985) DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **54**, 665-97.
- Wang JC (1996) DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **65**, 635-92.
- Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 430-40.
- Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-8.
- Weil R, Vinograd J (1963) The Cyclic Helix and Cyclic Coil Forms of Polyoma Viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **50**, 730-8.
- Wellinger RE, Prado F, Aguilera A (2006) Replication fork progression is impaired by transcription in hyperrecombinant yeast cells lacking a functional THO complex. *Mol Cell Biol* **26**, 3327-34.
- Whitby MC, Vincent SD, Lloyd RG (1994) Branch migration of Holliday junctions: identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *EMBO J* **13**, 5220-8.
- Wickner S, Hurwitz J (1975) Interaction of Escherichia coli dnaB and dnaC(D) gene products in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 921-5.
- Woldringh CL (2002) The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Mol Microbiol* **45**, 17-29.
- Worcel A, Burgi E (1972) On the structure of the folded chromosome of Escherichia coli. *J Mol Biol* **71**, 127-47.
- Wu HY, Shyy SH, Wang JC, Liu LF (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* **53**, 433-40.
- Xu B, Clayton DA (1995) A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Mol Cell Biol* **15**, 580-9.
- Ye F, Brauer T, Niehus E, Drlica K, Josenhans C, Suerbaum S (2007) Flagellar and global gene regulation in *Helicobacter pylori* modulated by changes in DNA supercoiling. *Int J Med Microbiol* **297**, 65-81.

- Young RA, Steitz JA (1978) Complementary sequences 1700 nucleotides apart form a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3593-7.
- Yu K, Chedin F, Hsieh CL, Wilson TE, Lieber MR (2003) R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol* **4**, 442-51.
- Yu K, Roy D, Bayramyan M, Haworth IS, Lieber MR (2005) Fine-structure analysis of activation-induced deaminase accessibility to class switch region R-loops. *Mol Cell Biol* **25**, 1730-6.
- Zaitsev EN, Kowalczykowski SC (2000) A novel pairing process promoted by *Escherichia coli* RecA protein: inverse DNA and RNA strand exchange. *Genes Dev* **14**, 740-9.
- Zarrin AA, Alt FW, Chaudhuri J, Stokes N, Kaushal D, Du Pasquier L, Tian M (2004) An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* **5**, 1275-81.
- Zechiedrich EL, Cozzarelli NR (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **9**, 2859-69.
- Zechiedrich EL, Khodursky AB, Bachellier S, Schneider R, Chen D, Lilley DM, Cozzarelli NR (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 8103-13.
- Zechiedrich EL, Khodursky AB, Cozzarelli NR (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**, 2580-92.
- Zellars M, Squires CL (1999) Antiterminator-dependent modulation of transcription elongation rates by NusB and NusG. *Mol Microbiol* **32**, 1296-304.
- Zhang Y., J. Zhang, K. P. Hoefflich, M. Ikura, G. Qing, and M. Inouye. 2003. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **12**:913-923.
- Zhang Y., L. Zhu, J. Zhang, and M. Inouye. 2005. Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**:26080-26088.
- Zhu Q, Pongpech P, DiGate RJ (2001) Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9766-71.
- Zubay G (1973) In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet* **7**, 267-87.
- Zuo Y, Deutscher MP (2002) Mechanism of action of RNase T. I. Identification of residues required for catalysis, substrate binding, and dimerization. *J Biol Chem* **277**, 50155-9.
- Zuo Y, Deutscher MP (2002) Mechanism of action of RNase T. II. A structural and functional model of the enzyme. *J Biol Chem* **277**, 50160-4.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord à mon directeur de recherche Marc Drolet. Marc a été d'un support constant et dynamique durant toute la période que j'ai passée au sein de son laboratoire. Je le remercie aussi pour m'avoir inculqué les bonnes valeurs en sciences, c'est-à-dire la rigueur, le questionnement, la réflexion, la suite dans les idées, la persévérance et bien d'autres. Les nombreuses discussions sur les sujets de recherche furent souvent animées de belles idées et étaient très enrichissantes.

Mes compagnons d'études sont les autres personnes avec qui j'ai également partagé la passion de la science. En particulier Chadi Hraiky, avec qui j'ai passé des moments inoubliables et qui a toujours été à mon égard d'une aide infaillible et d'une générosité hors norme. Martin Clément, qui travaille dans le laboratoire voisin et qui répondait toujours à mes nombreuses questions sur les protéines. Tous les membres de notre laboratoire, Sonia Broccoli, Charles Fortin, Patrick Sanscartier, Flora Nolent, Valentine Usongo et les autres.

Finalement, je remercie aussi tous les autres membres et les directeurs des laboratoires adjacents avec qui j'ai partagé cordialement les équipements scientifiques et une bière à l'occasion. Je remercie également les membres de l'administration du département de Microbiologie et Immunologie.

